WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GXP



СИСТЕМА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Maurice

Исследование моноклональных антител, сложных молекул и АЦП

Всего за 15-35 мин!

proteinsimple
a bioTechne brand

стр. 285

В НОМЕРЕ:

РАЗРАБОТКА МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, СОДЕРЖАЩИХ ТВЕРДЫЕ ДИСПЕРСИИ

РАЗРАБОТКА НЕИНЪЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ТЕРАПИИ

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА КАБАЗИТАКСЕЛ

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К СПЕЦИАЛИСТУ ПО КОНТРОЛЮ И ПРОВЕДЕНИЮ ИСПЫТАНИЙ КАЧЕСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНОИНДОЛЬНЫМИ АЛКАЛОИДАМИ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТЕЧЕСТВЕННОГО И ЗАРУБЕЖНОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РЫНКОВ СПРЕЕВ ДЛЯ НОСА

№ 1 (22) ФЕВРАЛЬ 2018

18+

Summum bonum medicinae sanitas

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

Pharmcontract group of companies

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

ПРОЕКТИРОВАНИЕ

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

СТРОИТЕЛЬСТВО

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

ИНЖИНИРИНГ И КОМПЛЕКС ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

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



ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

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

ЛАБОРАТОРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ

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

СЕРВИС, ВАЛИДАЦИЯ, ОБУЧЕНИЕ

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



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

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

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

WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

Директор журнала
Дорина Е.А., к.п.н.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Редактор-корректор:
Троицкая Е.Н.

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

Journal director
Dorina E.A., PhD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Corrector:
Troitskaya E.N.

При поддержке ФБУ «ГИЛС и НП»

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

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

Ответственность за опубликованные материалы несут авторы

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

ISSN 2305-2066

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

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

ISSN 2305-2066

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

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

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

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

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Содержание

Contents

От редакции	8	**Introduction**
События. Мероприятия	10	**Events**
Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»		**«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part**
Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»		***«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section***
Кедик С.А., Омельченко О.А., Суслов В.В., Шняк Е.А.	32	*Kedik S.A., Omelchenko O.A., Suslov V.V., Shnyak E.A.*
РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НАЛТРЕКСОНА ОСНОВАНИЯ, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ		DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE PREPARATION OF THE NALTREXONE BASE ENCAPSULATED IN POLYMERIC MICROPARTICLES
Грих В.В., Краснюк И.И. (мл.), Степанова О.И., Беляцкая А.В., Краснюк И.И., Тарасов В.В., Козин Д.А., Нестеренко Е.	36	*Grih V.V., Krasnyuk I.I. (jr.), Stepanova O.I., Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Tarasov V.V., Kozin D.A., Nesterenko E.*
РАЗРАБОТКА МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, СОДЕРЖАЩИХ ТВЕРДЫЕ ДИСПЕРСИИ		DEVELOPMENT OF PRODUCING SOFT MEDICINAL FORMS CONTAINING SOLID DISPERSION
Шикова Ю.В., Зайцева О.Е., Кадыров А.Р., Симонян Е.В., Лиходед Т.А.	40	*Shikova Yu.V., Zaytseva O.E., Kadyrov A.R., Simonyan E.V., Lihoded T.A.*
РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДРАЖЕ С ИЗОНИАЗИДОМ И ОФЛОКСАЦИНОМ		DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY FOR THE PREPARATION OF THE DRAGEE WITH IZONIAZIDE AND OILOXACIN
Секция «Современные ингредиенты лекарственных форм»		***«Modern Ingredients of Drugs» section***
Ивкин Д.Ю., Теслев А.А., Дзюба А.С., Ивкина А.С.	46	*Ivkin D.Yu., Teslev A.A., Dziuba A.S., Ivkina A.S.*
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРЕПАРАТОВ ТОРАСЕМИДА		TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EXCIPIENTS OF DRUG PRODUCTS OF TORASEMIDE
Секция «Технологический контроль лекарственных форм»		***«Technological Control of Drugs» section***
Ляпунов Н.А., Безуглая Е.П., Бовтенко В.А., Столпер Ю.М.	54	*Lyapunov N.A., Bezuglaya E.P., Bovtenko V.A., Stolper Yu.M*
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АЭРОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЭРОЗОЛЕЙ САЛЬБУТАМОЛА		COMPARATIVE ASSESSMENT OF AERODYNAMIC PROPERTIES OF SALBUTAMOL PRESSURIZED METERED DOSE INHALERS
Секция «Проекты профессиональных стандартов в области разработки наноструктурированной фармацевтической продукции»		***«Projects of Professional Standards in the Field of Nanostructured Pharmaceuticals Development» section***
Кедик С.А., Бабиков А.Н., Жаворонок Е.С., Ахмедова Д.А., Засыпкина Н.А., Краснова И.Ю	62	*Kedik S.A., Babikov A.N., Zhavoronok E.S., Akhmedova D.A., Zasypkina N.A., Krasnova I.Yu.*
ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К СПЕЦИАЛИСТУ ПО КОНТРОЛЮ И ПРОВЕДЕНИЮ ИСПЫТАНИЙ КАЧЕСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ		DEVELOPMENT OF THE STANDARD FOR EDUCATION OF THE SPECIALIST FOR CONTROL AND TESTING THE QUALITY OF NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

Шаталов Д.О., Кедик С.А., Бабиков А.Н., Стерин И.В. **68** *Shatalov D.O., Kedik S.A., Babikov A.N., Sterin I.V.*

РАЗРАБОТКА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ПОДГОТОВКЕ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

DEVELOPMENT OF PROFESSIONAL STANDARD FOR SPECIALISTS ON PREPARATION AND OPERATION OF EQUIPMENT FOR MANUFACTURING NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

Кедик С.А., Бабиков А.Н., Жаворонок Е.С., Твердохлебова А.М. **72** *Kedik S.A., Babikov A.N., Zhavoronok E.S., Tverdokhlebova A.M.*

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К СПЕЦИАЛИСТУ-ИССЛЕДОВАТЕЛЮ ПО РАЗРАБОТКЕ РЕЦЕПТУРЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

FORMATION OF REQUIREMENTS TO SPECIALIST-EXPLORER IN DEVELOPMENT OF RECEIPT OF NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

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**

Барсукова Ю.Н., Мельникова О.А., Мельников М.Ю. **76** *Barsukova Yu.N., Melnikova O.A., Melnikov M.Yu.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТЫ АМИНОКАПРОНОВОЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОМ ГЕМОСТАТИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUES OF DETERMINATION OF AMINOCAPROIC ACID IN A MULTI-COMPONENT HEMOSTATIC AGENT

Зозина В.И., Горошко О.А., Красных Л.М., Кукес В.Г. **84** *Zozina V.I., Goroshko O.A., Krasnykh L.M., Kukes V.G.*

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОКИСЛЕННОГО И ВОССТАНОВЛЕННОГО КОЭНЗИМА Q_{10} В БИОМАТЕРИАЛЕ (ОБЗОР)

THE MODERN METHODS OF ANALYSIS OF OXIDIZED AND REDUCED FORMS OF COENZYME Q_{10} IN BIOMATERIAL (REVIEW)

Баталова Т.Л., Остапюк О.А., Савельева К.Р., Андреевичева Т.Ю., Персанова Л.В., Поляков С.В., Шестаков В.Н. **90** *Batalova T.L., Ostapyuk O.A., Saveleva K.R., Andreevicheva T.Y., Persanova L.V., Polyakov S.V., Shestakov V.N.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТОРИКОКСИБА В ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

DEVELOPMENT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETORICOXIB IN SOLID PHARMACEUTICAL FORMS BY HPLC

Эпштейн Н.А., Севастьянова В.Л., Королева А.И. **96** *Epshtein N.A., Sevastianova V.L., Koroleva A.I.*

ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ВЭЖХ И УЭЖХ: СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД, ВКЛЮЧАЮЩИЙ АНАЛИЗ РИСКОВ

INVESTIGATION OF ROBUSTNESS AT VALIDATION OF HPLC AND UPLC METHODS: A MODERN APPROACH INCLUDING RISK ANALYSIS

Секция «Химико-токсикологический анализ» **«Chemical and Toxicological Analysis» section**

Колотова Н.В., Старкова А.В. **110** *Kolotova N.V., Starkova A.V.*

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЗАМЕЩЕННЫХ АМИДОВ ФТАЛЕВЫХ КИСЛОТ

BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONOSUBSTITUTED AMIDES OF PHTALIC ACIDS

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

Соснов А.В., Семченко Ф.М., Власов М.И., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А., Кинзирский А.С. **114** *Sosnov A.V., Semchenko F.M., Vlasov M.I., Tohmahchi V.N., Sosnova A.A., Kinzirsky A.S.*

РАЗРАБОТКА НЕИНЪЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ТЕРАПИИ

DEVELOPMENT OF NON-INJECTABLE MEDICINAL DRUGS ACTING ON CNS FOR EMERGENCY THERAPY

Мельникова О.А., Муратов Д.Н., Ситников А.Ф., Шориков Е.В., Кобесова Д.Ю.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ^{68}Ga

134 *Melnikova O.A., Muratov D.N., Sitnikov A.F., Shorikov E.V., Kobesova D.Yu.*

MODERN ISSUES OF ORGANIZING RADIO PHARM PREPARATIONS PRODUCTION BASED ON ^{68}Ga

Абышев А.З., Нгуен К.Б., Зинчук Л.Н.

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КЕТО-КЕТАЛЬНЫХ ИЗОМЕРОВ ВАРФАРИНА СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

138 *Abyshev A.Z., Nguyen K.B., Zinchuk L.N.*

ANALYSIS OF STRUCTURAL FEATURES OF THE KETO-KETAL ISOMERS OF WARFARIN BY SPECTRAL METHODS

Секция «Контроль качества биопрепаратов»

«Biochemicals Quality Control» section

Тринеева О.В., Халахакун А.Д., Сливкин А.И., Чупандина Е.Е.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНОИНДОЛЬНЫМИ АЛКАЛОИДАМИ

146 *Trineeva O.V., Halahakoon A.J., Slivkin A.I., Chupandina E.E.*

MORPHOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE CARRIERS INCAPULATED BY TERPINEINDOLIC ALKALOIDS

Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Волох О.А.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНТРОЛЮ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

152 *Gaeva A.V., Gromova O.V., Durakova O.S., Generalov S.V., Volokh O.A.*

MODERN APPROACHES TO THE CONTROL OF ACTIVE COMPONENTS OF CHOLERA CHEMICAL VACCINE

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Комаров Б.А., Погорельская Л.В., Албулов А.И.

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОНТРОЛЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

158 *Komarov B.A., Pogorel'skaya L.V., Albulov A.I.*

SOME DATA FOR SUBSTANTIATION OF CONTROLLING MICROELEMENT COMPOSITION OF HERBAL PLANT RAW MATERIALS

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

«Drug Products Efficacy and Safety» part

Секция «Кинетика растворения»

«Dissolution Profile Test» section

Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В., Родионова Е.Ю.

УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАРАЦЕТАМОЛА, СФОРМИРОВАННОЙ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КРИСТАЛЛОВ РОМБИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

162 *Belyaev A.P., Rubets V.P., Antipov V.V., Rodionova E.Y.*

STABILITY OF DRUG FORM OF PFRACETAMOL, FORMED ON THE BASIS OF CRYSTALS OF ROMBIC MODIFICATION

Дружининская О.В., Смехова И.Е.

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ДЖЕНЕРИКОВ АТОРВАСТАТИНА

166 *Druzhininskaya O.V., Smekhova I.E.*

USE OF DISSOLUTION TEST FOR EVALUATION OF PHARMACEUTICAL EQUIVALENCE OF ATORVASTATIN GENERICS

Секция «Доклинические исследования»

«Preclinical Trials» section

Авдеева О.И., Шекунова Е.В., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Хайменов А.Я.

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА КАБАЗИТАКСЕЛ

174 *Avdeeva O.I., Shekunova E.V., Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Makarov V.G., Hymenov A.Ya.*

ESTIMATION OF TOXIC EFFECTS OF MEDICINAL PREPARATION OF CABAZITAXEL

Сенина А.С., Москвин А.В., Гурина С.В., Авенирова Е.Л. **180** *Senina A.S., Moskvin A.V., Gurina S.V., Avinirova E.L.*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОГАЛОГЕНИДОВ АМИДРАЗОНОВ

BIOLOGICAL ACTIVITY OF HYDROGENALIDES OF AMIDEZONE

Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Литвинов А.А., Логвинова Е.А., Морковин Е.И., Бакулин Д.А., Волотова Е.В. **186** *Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Litvinov A.A., Logvinova E.A., Morkovin E.I., Bakulin D.A., Volotova E.V.*

МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРОВ

ACUTE STROKE MODELS USED IN PRECLINICAL RESEARCH

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

Мареев И.В., Самыкина И.А., Колокольцова М.Ю., Пименов И.Д., Тимофеев М.С., Куликов Е.С., Деев И.А., Бородулина Е.В., Кобякова О.С., Удут В.В. **198** *Mareev I.V., Samykina I.A., Kolokoltsova M.Y., Pimenov I.D., Tomofeev M.S., Kulikov E.S., Deev I.A., Borodulina E.V., Kobyakova O.S., Udut V.V.*

МОТИВАЦИЯ И ОПЫТ УЧАСТИЯ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ В РОССИИ

MOTIVATION AND PARTICIPATION EXPERIENCE OF HEALTHY VOLUNTEERS IN THE CLINICAL TRIALS OF BIOEQUIVALENCE IN RUSSIA

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

Карташов В.А., Чепурная Г.П., Чернова Л.В. **206** *Kartashov V.A., Chepurnaya G.P., Chernova L.V.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАЛЕПЛОНА, ЗОЛПИДЕМА И ЗОПИКЛОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

DEFINITION OF ZALEPLON, ZOLPIDEM AND ZOPICLON IN BIOLOGICAL OBJECTS

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

Кинев М.Ю., Петров А.Ю. **216** *Kinev M.Yu., Petrov A.Yu.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТЕЧЕСТВЕННОГО И ЗАРУБЕЖНОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РЫНКОВ СПРЕЕВ ДЛЯ НОСА С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА ПЕРСПЕКТИВ ДАЛЬНЕЙШЕЙ ИХ РАЗРАБОТКИ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DOMESTIC AND FOREIGN PHARMACEUTICAL MARKETS FOR THE NOSE WITH THE PURPOSE OF SEARCHING FOR FUTURE DEVELOPMENT PROSPECTS

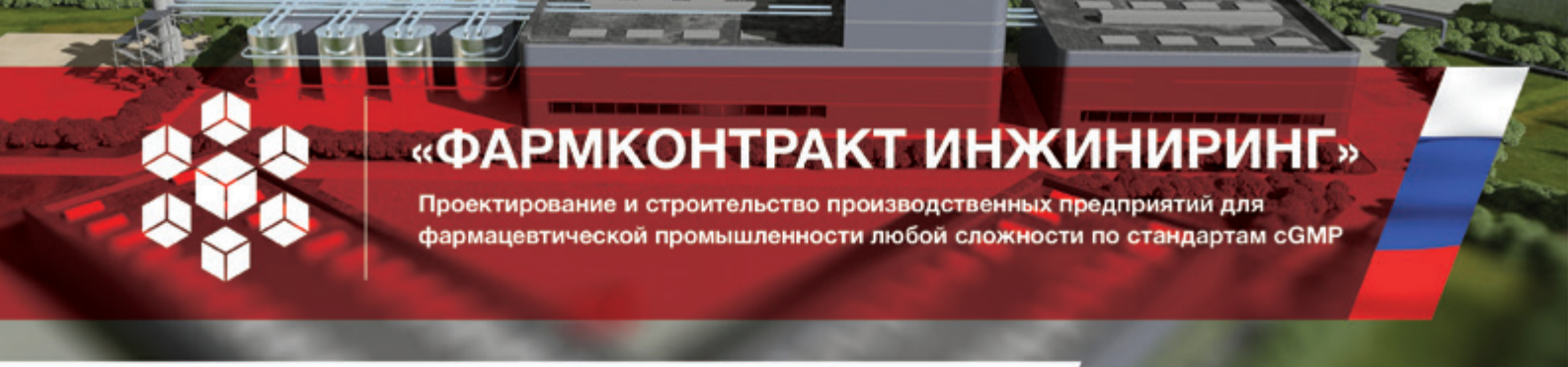
Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Москвин А.В., Шигарова Л.В., Ивкин Д.Ю., Ивкина А.С. **226** *Narkevich I.A., Flisyuk E.V., Moskvin A.V., Shigarova L.V., Ivkin D.Y., Ivkina A.S.*

СЕРТИФИКАЦИЯ НА СООТВЕСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ ИСО 9001 КАК ПЕРВЫЙ ЭТАП ВНЕДРЕНИЯ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ В ЦЕНТРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

CERTIFICATION FOR THE CONFORMITY OF ISO 9001 EQUIREMENTS AS A FIRST PHASE OF IMPLEMENTATION OF GOOD LABORATORY PRACTICE IN THE CENTER OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

Сообщения: исправления и поправки **232** ***Messages: corrections***

Публикации партнеров **234** ***Partner Publications***



«ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ»

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

сертификат ИСО 9001-2011 (ISO 9001:2008)

ГЕНПОДРЯД

ПОЛНЫЙ ЦИКЛ РАБОТ **«ПОД КЛЮЧ»** ОТ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ

СОПРОВОЖДЕНИЕ ПРОЕКТА:

- Эскизный проект, Мастер-план, Вариантное проектирование, Комплексная разработка проекта
- Согласование проектной документации для организации производства
- DQ квалификация проектной документации для подтверждения соответствия проекта и здания стандартам GMP
- Разработка нескольких вариантных проектов решений, ТЭО и выбора наиболее соответствующего заданным производственным мошностям вариантов

УПРАВЛЕНИЕ ПРОЕКТОМ:

- Управление процессами закрепленным за проектом КАМом, полное документальное сопровождение проекта
- Управление сроками в формате календарного плана от получения заявки и составления договора до проведения валидации и сдачи объекта
- Управление финансами: отслеживание исполнения бюджета в режиме реального времени
- Управление качеством



В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ РЕАЛИЗУЕТСЯ 4 ПРОЕКТА ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ:



Цех по производству фармацевтической субстанции **«Мирамистин» («Инфамед К»)**



Реконструкция и оснащение оборудованием **7, 9, 15 и 26** корпусов **ПАО «Биохимик»** общей площадью более **30 тыс. м²**

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



ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ

«ПОД КЛЮЧ»

СОЗДАЕМ ПРОЕКТЫ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ:

СООТВЕТСТВУЕТ СТАНДАРТУ GMP (GOOD MANUFACTURING PRACTICE)

ТЗ КОНЦЕПТПРОЕКТ
РАЗРАБОТКА ПРОЕКТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ
СОЗДАНИЕ ПАКЕТА РАБОЧЕЙ ДОКУМЕНТАЦИИ





- **Собственное современное производство конструкций «Чистых помещений»**
- **Исполнение по типовым и индивидуальным размерам**
- **Монтаж и шеф-монтаж конструкций нашими инженерами**

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



Михаил Пергаев
Директор по проектированию и строительству



Павел Путилин
Главнй инжинер проекта



Галина Лемперт
Главный инженер-технолог-проектировщик, специалист по валидации



Петр Рязанцев
Ведущий технолог-проектировщик



Александр Кузьмичев
Главный инженер проекта



Василий Норсеев
Проектировщик электрических систем



Мария Резниченко
Архитектор



Евгений Гущин
Инженер-конструктор



Екатерина Каплун
Инженер-проектировщик



Дарья Отморская
Технолог-проектировщик



Ирина Сахарова
Сметчик



Надежда Григоревская
Технолог-проектировщик систем



Василий Кутуков
Технолог-проектировщик



Олеся Васильчук
Технолог-проектировщик



Евгений Полуянов
Технолог-проектировщик



Максим Шировок
Старший специалист-сметчик

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 134-50-87
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
info@phct-engineering.ru

8 800 333-91-29
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct-engineering.ru

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

Прежде всего позвольте от лица Редакции выразить вам признательность за то, что вот уже более 5 лет вы остаетесь с нами и выбираете качественную научную литературу. Мы ценим вашу поддержку, которая является неотъемлемым звеном в стремлении удержать марку № 1 среди огромного обилия журналов и газет о новинках фармацевтического рынка. Спасибо, что вы остаетесь с нами!

В этом номере мы постарались собрать самые интересные и актуальные материалы не только о последних изменениях в области национального и наднационального законодательства, международных стандартов в сфере надлежащих производственных и лабораторных практик (Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Москвин А.В., Шигарова Л.В., Ивкин Д.Ю., Ивкина А.С. Сертификация на соотвествие требованиям ИСО 9001 как первый этап внедрения надлежащей лабораторной практики в центре экспериментальной фармакологии; Мельникова О.А., Муратов Д.Н., Ситников А.Ф., Шориков Е.В., Кобесова Д.Ю. Современные вопросы организации производства радиофармпрепаратов; и другие). На страницах февральского номера вы впервые сможете познакомиться с проектами профессиональных стандартов в области разработки наноструктурированной фармацевтической продукции, подготовленными сотрудниками НПФ «Материа Медика Холдинг» совместно с ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ) и ЗАО «Институт фармацевтических технологий» по поручению Фонда инфраструктурных и образовательных программ («РОСНАНО»). Помимо этого, в номе вы найдете статьи о разработках ваших коллег при создании различных лекарственных форм: Кедик С.А., Омельченко О.А., Суслов В.В., Шняк Е.А. Разработка способа получения Налтрексона основания, инкапсулированного в полимерные микрочастицы; Грих В.В., Краснюк И.И. (мл.), Степанова О.И., Беляцкая А.В., Краснюк И.И., Тарасов В.В., Козин Д.А., Нестеренко Е. Разработка мягких лекарственных форм, содержащих твердые дисперсии; Шикова Ю.В., Зайцева О.Е., Кадыров А.Р., Симонян Е.В., Лиходед Т.А. Разработка состава и технологии получения драже с Изониазидом и Офлоксацином. Также в номере ряд материалов посвящен современным методикам контроля качества выпускаемых на российский рынок фармацевтических продуктов и проблеме участия добровольцев в исследованиях биоэквивалентности в России.

Традиционно в февральском номере эксклюзивные материалы самых знаковых событий для фармацевтической отрасли, которыми завершился 2017 год: доклады участников круглого стола о контрактном производстве, самые интересные выкладки из презентаций спикеров семинара «Разработка и регистрация лекарственных средств», который мы вот уже 3 года проводим на площадке итоговой для отрасли выставки Pharmtech & Ingredients, конечно же, сам репортаж об этой выставке и рекомендации специалистов в области разработки и регистрации лекарственных средств по надлежащим GxP-стандартам в условиях единого рынка ЕАЭС. Это и многое другое предваряет материал о том, как завершился ушедший год для нашего главного учредителя, благодаря которому журнал не только остается на рынке, но и активно развивается.

Надеемся, что каждый из вас найдет ответы на вопросы, которые возникают в вашей профессиональной практике, а некоторые из вас пополнят ряды наших авторов.

С уважением, Редакция журнала

САМЫЕ ЧИТАЕМЫЕ

И ВОСТРЕБОВАННЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМ РЫНКОМ

бесплатные*
ЖУРНАЛЫ
от ГК "Фармконтракт"









www.pharmjournal.ru

Научно-производственный рецензируемый журнал **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**

www.gmpnews.ru

Первый информационный проект о надлежащих производственных практиках **«Новости GMP»**

www.cleanrooms.ru

Научно-практический журнала **«Чистые помещения и технологические среды»**

Только проверенная актуальная информация и экспертные мнения!

* Подробности уточняйте в редакциях

«АКТИВНЫЙ КОМПОНЕНТ» ЗАПУСТИТ ПРОИЗВОДСТВО НА НОВОЙ ПЛОЩАДКЕ УЖЕ В 2018 ГОДУ

20 декабря, Москва – Санкт-Петербург.

ЗАО «Активный Компонент» и ГК «Фармконтракт» заключили соглашение на разработку концепт-проекта для строительства завода по производству российских субстанций в г. Пушкине (Санкт-Петербург) площадью 20 000 кв. м.

Компании договорились о проектировании первой очереди мало- и среднетоннажного участка для производства активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) площадью 3000 кв. м на территории завода. Работы будут завершены к концу IV квартала 2018 года. Объем выпускаемой продукции на новом производственном участке будет доведен до 40 тонн в год.

В ходе реализации проектным бюро ГК «Фармконтракт» будет проведена предпроектная проработка, подготовка концептуального проекта и разработка рабочей документации.

«В настоящее время мы находимся на завершающих этапах ряда проектов со схожими задачами, – пояснил президент ГК «Фармконтракт» **Сергей Быковский**. [Речь идет о производственном комплексе для синтеза фармацевтической субстанции Мирамистин® и цеха по производству субстанций для ПАО «Биохимик».] – Поэтому участие нашего инжинирингового подразделения в выполнении проектно-строительных работ для предприятия, с которым тесно сотрудничает наше дистрибьюторское подразделение, принесет только положительные результаты. В частности, еще на стадии проекта инжиниринговый отдел предусмотрит и предложит варианты, которые позволят масштабировать синтез и производство новых фармацевтических субстанций на промышленный уровень, тем самым минимизируя будущие затраты партнера. В качестве варианта оснащения будут предложены лучшие реакторные системы от наших швейцарских партнеров без каких-либо наценок, которые устанавливают перекупщики».



«Новое производство в г. Пушкине будет ориентировано как на масштабирование уже производимых субстанций, так и на выпуск новых продуктов компании, находящихся в разработке. Это порядка 10 новых номенклатурных позиций субстанций в год. Производственные линии на нынешней площадке в пос. Металлострой (Санкт-Петербург) перегружены, поэтому часть производства мы планируем перенести на новый завод уже в конце 2018 года», – сообщил президент компании «Активный Компонент» **Александр Семёнов**.

В планах «Активного Компонента» переход к многономенклатурному производству, а значит, еще на стадии проектных работ требуется предусмотреть максимально эффективные решения, способные предотвратить загрязнение сырья другим продуктом во время технологического процесса. Для этого ГК «Фармконтракт» будут учтены не только требования надлежащей производственной практики, предъявляемые к выпуску самого продукта, но и правила расположения оборудования, предъявляемые производителями, например реакторных систем, для гарантии правильного перемещения материалов и их хранения.

При выпуске экспортной продукции будут учитываться как национальные, так и международные стандарты GMP и требования EMEA, которые предъявляют зарубежные партнеры при проведении аудитов. Что касается конкретных проектных решений, то уже сейчас прорабатываются вопросы по организации в рамках существующего здания буферного склада ЛВЖ, зоны подготовки технологической одежды для персонала, очистки производственных выбросов воздуха и сточных вод, влажных технических продуктов.

Материал предоставлен Пресс-службой ГК «Фармконтракт».

ГК «ФАРМКОНТРАКТ» ПРИЗНАНА ЛИДЕРОМ ОТРАСЛИ

31 января 2018 года ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» получил высокую оценку и признание своего весомого вклада в развитие российской экономики. По итогам 2017 года холдингу присвоено звание «Лидер отрасли».



Декабрь для российских компаний – традиционно период окончания финансового года, по итогам которого независимые рейтинговые агентства формируют short list наиболее успешных и отличившихся. Так, согласно данным Федеральной статистической службы России по Центральному федеральному округу, дистрибьюторское подразделение холдинга вошло в 5-ку лучших соответствующего отраслевого рейтинга.

Поскольку рейтинг базируется исключительно на данных государственных органов статистики, он отражает ситуацию с реальными лидерами экономики страны в каждой отрасли. Кстати, среди поставщиков технологического и лабораторного оборудования для фармацевтической отрасли «Фармконтракт» стал единственной компанией, которая по данным о выручке от продаж, оборотных активов, валовой прибыли, прибыли от продаж, капитала и резервов, валюты баланса сразу попала на 4 место в рейтинге дистрибьюторов оборудования.

«Конечно, нам приятно, что работу всей команды оценили на столь высоком уровне, – прокомментировал получение награды президент ГК «Фармконтракт» **Сергей Быковский**. – Но столь высокие показатели именно дистрибьюторской деятельности уже невозможны без комплексного подхода, который мы реализуем на протяжении нескольких лет, создавая с нуля или реконструируя фармзаводы, прорабатывая схемы технологических линий по выпуску конкретных серий и форм лекарственных средств заданной производственной мощности. Сейчас с дистрибьюторскими подразделениями холдинга работает более 4 тысяч российских предприятий химико-фармацевтической, нефтехимической, пищевой и биотехнологической отраслей. Собственная сервисная служба обеспечивает бесперебойную работу и постгарантийную техническую поддержку поставленного парка оборудования более чем на 2,5 тыс. площадках. Существующее чуть меньше 2 лет собственное проектное бюро («Фармконтракт Инжиниринг») уже реализует 4 проекта федерального значения:

- близится к завершению создание цеха производства фармацевтических субстанций, спроектированного по заказу «Инфамед К» в полном соответствии с международными стандартами GMP, который уже прошёл квалификацию в ЕС. Производство будет оснащено самым современным высокотехнологичным швейцарским, немецким и итальянским оборудованием, позволяющим осуществлять синтез широкого спектра субстанций, в том числе и на контрактной основе;



- ведется полномасштабная реконструкция и оснащение оборудованием 3-х производственных комплексов по выпуску готовых лекарственных средств и активных фармацевтических субстанций одного из старейших фармазаводов России –



«Биохимик» – общей площадью 30 тыс. м^2 (7, 9, 15 и 26 корпуса). В частности, в 26-м корпусе завершены строительно-монтажные работы по инженерным сетям».

Проектный офис выполняет проектные работы для 6 предприятий федерального значения:

- ЗАО «Активный Компонент».
- АО «Химический завод им. Л.Я. Карпова».
- ОАО «Кировская фармацевтическая фабрика».
- 7, 9 и 15 корпуса ПАО «Биохимик».

На производственных комплексах «Аспектус Фарма» (ГК «Евросервис») и ЗАО «МБНПК «Цитомед» завершаются пуско-наладочные работы всего комплекса оборудования.

Расширение отраслей присутствия (вся химическая, пищевая промышленность, включая кондитерскую, электронная и биотехнологическая) и распространение на них аналогичного принципа «одного окна», безусловно, то слагаемое, которое обеспечивает постоянный рост продаж. Сегодня любой потребитель из сегмента b2b заинтересован в минимизации рисков срыва сроков реализации проектов и выбирает одного ответственного исполнителя, действия которого может контролировать в любое время, а также несущего всю полноту ответственности за проект. Гораздо проще взаимодействовать с профессионалами, говорящими с вами на одном языке, а потом – уже без вовлечения заказчика, внутри своей команды, – переводящими «пожелания» завода на инженерный язык, что позволяет еще на стадии проектирования производственного участка, технологической линии, лаборатории контроля качества или же всего завода учесть все нюансы, от вывода и подвода инженерных сетей до подбора именно того оборудования, которое обеспечит требуемую производительность, а в будущем позволит безболезненно провести масштабирование производства до промышленного уровня.

Еще одним слагаемым успеха компании, оцененного и признанного на государственном уровне, конечно же, является ее команда. Неравнодушие квалифицированных менеджеров, предоставляющих сравнительный срез преимуществ каждой аналогичной модели производственного оборудования под бюджет заказчика, грамотное руководство и мотивация персонала со стороны управляющего состава, его непосредственная вовлеченность практически в каждый проект – вот то немногое, что всегда отличало и продолжает отличать этого лидера отрасли.

«Также в целях расширения клиентского сервиса в прошлом году началась полномасштабная реконструкция испытательной лаборатории «ОЛФАРМ», предоставляющей весь спектр услуг в сфере разработки, испытания и доклинических исследований как воспроизведенных, так и инновационных лекарственных средств, а также проведения контроля качества субстанций и готовых лекарственных форм», – отмечает **Сергей Быковский**.

Ранее в СМИ появилась информация о том, что новый виток развития лаборатории подразумевает не просто расширение площадей, спроектированных и прошедших полное переоснащение по международному стандарту GLP. В планах лаборатории, аккредитованной на проведение контроля качества активных субстанций и готовых лекарственных форм и лицензированной на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 группы патогенности, – расширение области аккредитации. Среди таких областей появилось право на осуществление деятельности по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений.

Подтверждая стремительный рост и признание ГК «Фармконтракт», стоит отметить и серьезный вклад в образовательную и социальную сферы. Так, с 2018 года в портфеле собственных СМИ холдинга появился журнал «Чистые помещения и технологические среды», 2 года назад компания приобрела все права на журнал «Новости GMP», который является № 1 в фармацевтической отрасли.

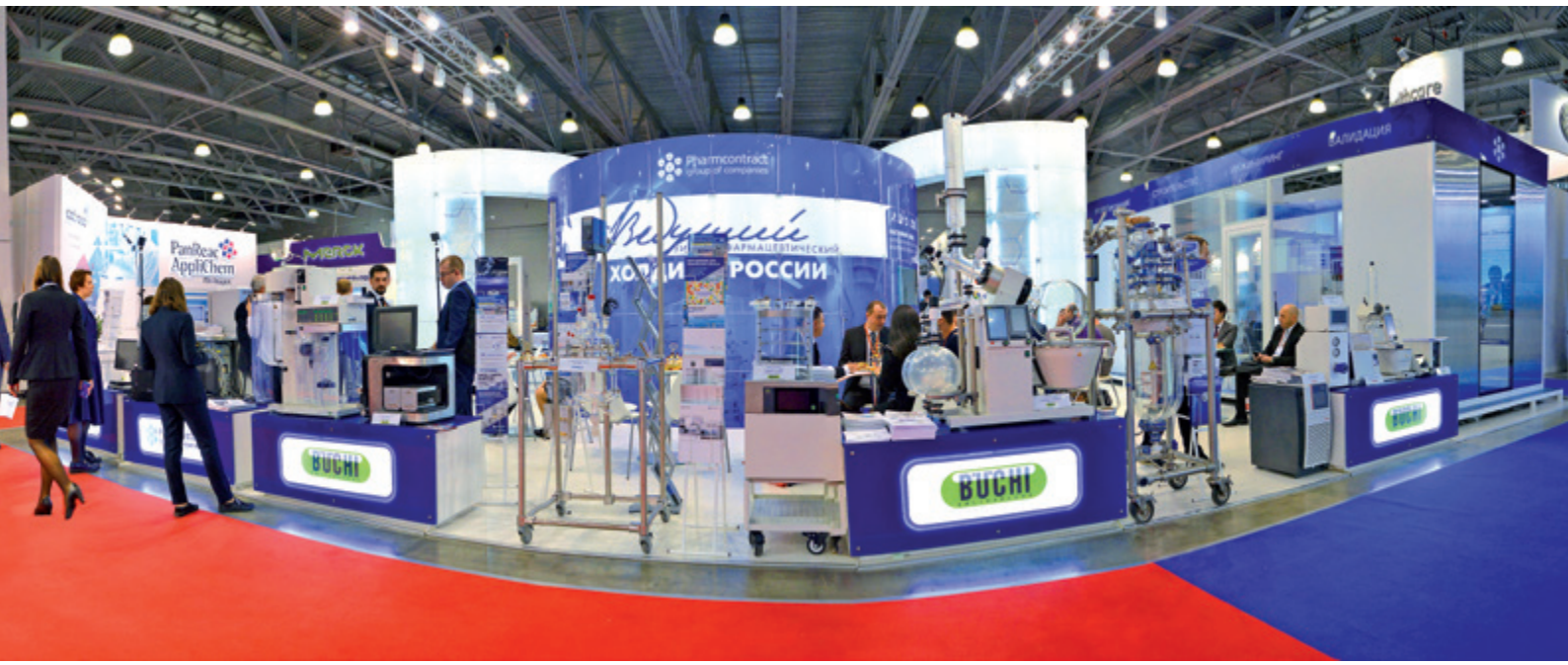
«Мы благодарим наших клиентов и партнеров за высокий уровень доверия, который они оказывают нам, несмотря на регулярно происходящие изменения как в международной, так и в национальной экономике! Ваша поддержка позволяет уверенно смотреть в будущее, разрабатывать и первыми внедрять на рынок новые инструменты и проекты, ориентированные на упрощение и оперативное решение возникающих производственных задач», – подвел итоги **Сергей Быковский**.

Справка:

Рейтинг составляется с 2007 года информационно-аналитической организацией «Бизнес-рейтинг», независимым аудитором «Евроконсалтинг» и ассоциацией «Совет экономического развития» в соответствии с общегосударственным стратегическим курсом развития России как страны с сильной, здоровой и стабильно развивающейся экономикой. Целью рейтинга является поощрение предприятий, их руководителей и трудовых коллективов, которые заботятся не только о прибыли собственного дела, но и делают большой вклад в будущее своего региона, края, республики и государства в целом. Благодаря их работе происходит наполнение государственного и местного бюджета, осуществляются социально-экономические программы, производятся отчисления в социальные и пенсионные фонды, создаются дополнительные рабочие места, развиваются новые технологии, внедряются инновации. Все это позволяет формировать новый современный тип экономики и бизнес-элиты Российской Федерации, ориентированный на использование последних достижений в управлении предприятиями и внедрение новейших открытий науки и техники в производство.

«PHARMTECH & INGREDIENTS – 2017»

С 21 по 24 ноября 2017 года в Москве с большим успехом прошла 19-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech & Ingredients – 2017». Сегодня «Pharmtech & Ingredients» – это единственный масштабный выставочный проект, где демонстрируются новейшие технологии в области производства лекарственных средств, проходят презентации новых единиц технологического и лабораторного оборудования, задействованного в этом процессе, и презентуются результаты и продукты, создаваемые в рамках федеральных целевых программ. На выставке можно найти компании, реализующие проекты «под ключ», а также подобрать новое оборудование и обсудить особенности его интеграции в существующую технологическую линию.



Согласно представленной организаторами «Pharmtech & Ingredients» (Группой компаний ITE, занимающей лидирующие позиции на рынке выставочных услуг России) статистике, в 2017 году в выставке приняла участие 401 компания из 30 стран мира, что на 18% больше, чем в прошлом году. Общая площадь экспозиции по сравнению с прошлым годом увеличилась на 18% и превысила 16 500 м^2. За 4 дня работы выставки её посетили 7 546 специалистов из 61 региона России и 40 зарубежных стран. По сравнению с прошлым годом число посетителей увеличилось на 16%.

Экспоненты продемонстрировали широкий спектр производственного и упаковочного оборудования, оборудование для лабораторий, проектно-технологические решения для создания фармацевтического производства под ключ, клинических испытаний, чистых помещений. Большинство участников демонстрировали представленное на своих стендах оборудование в действии. Раздел «Ingredients» объединил отечественных и зарубежных производителей высококачественных АФИ и функциональных ингредиентов, используемых сегодня в производстве современных лекарственных средств.

Выставка этого года вышла на новый уровень в плане деловой программы: за четыре дня гости и участники ключевого события года успели обсудить самые актуальные вопросы – от маркировки и контрактного производства до узкоспециализированных аспектов процесса R&D лекарственных средств. Всего в мероприятиях деловой программы приняли участие 1082 человека. Так, уже в первый день работы выставки большая часть российского фармрынка собралась на площадке, где представлен весь процесс фармпроизводства, для обсуждения принятых Государст-

венной Думой Российской Федерации в первом чтении поправок в ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств», вводящих обязательную маркировку всех лекарственных средств, с 1 января 2019 г.

Но только ли это стало причиной небывалого наплыва гостей?

Ежегодная выставка «Pharmtech & Ingredients» – это своего рода итоговая отчетная выставка российского фармпрома, где демонстрируются новейшие технологии в области производства лекарственных средств, проходит презентация новых единиц технологического и лабораторного оборудования, задействованного в этом процессе, и презентуются результаты и продукты, создаваемые в рамках федеральных целевых программ. Это место, где можно найти будущего исполнителя вашего проекта «под ключ», а также подобрать и обсудить особенности интеграции нового оборудования в существующую технологическую линию. Стоит отметить, что на российском рынке таких компаний, которые готовы реализовать весь проект от чистого поля до выпуска первой партии образца будущего продукта, не так много. На выставочной экспозиции «Pharmtech & Ingredients», пожалуй, была представлена только одна: ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт». Уже никого не удивляют масштабы экспозиции холдинга – они стали неотъемлемой частью крупнейших выставок страны. Однако наплыв посетителей приводит в недоумение. Чем же данная структура на протяжении стольких лет умудряется привлекать клиентов? Как ни странно, но первое место по популярности принадлежит далеко не новинкам оборудования, а именно комплексному подходу в вопросах проработки конкретного проекта. Если посмотреть на кадровый состав команды проектировщиков и технологов, то здесь можно встретить множество знакомых лиц из сферы производителей лекарственных средств. То есть проект реализуется такими же производственниками, которые знают и понимают «болевые» места российского производителя лекарственных средств; они общаются с заказчиками на их же языке и потом сами, внутри команды, переводят пожелания фармзавода на инженерный язык, что позволяет еще на стадии проектирования производственного участка, технологической линии, лаборатории контроля качества или же всего завода учесть все нюансы, от вывода и подвода инженерных сетей до подбора именно того оборудования, которое обеспечит требуемую производительность, а в будущем позволит безболезненно провести масштабирование производства до промышленного уровня.

Конечно же, выставочная экспозиция холдинга никогда не обходится без новинок. И если макет чистой зоны стал уже привычным атрибутом стенда ГК «Фармконтракт», как и таблеточные пресса от **Sejong**, то линии розлива **Bausch** для выпуска небольших партий жидких лекарственных средств привлекают внимание. «Промышленными линиями розлива сегодня трудно кого-то удивить. Да и такие машины, но только нашего чешского партнера **Imaco Group**, мы представляли на выставке «РосУпак», – поясняет выбор именно модели **542** от **Bausch** в качестве экспоната заместитель генерального директора по маркетингу и PR ГК «Фармконтракт» **Евгения Дорина**. – Летом мы получили много запросов от сектора R&D и небольших предприятий на автоматические системы розлива, которые позволяют провести дозировку 0,01–100 мл жидкого продукта за минуту в объеме до 4 000 доз. Поэтому на «Pharmtech» мы представили именно такую модель».

Из новинок на стенде ГК «Фармконтракт» стоит отметить и присутствие различных вариаций пресс-инструментов и матриц от **Natoli**, про которые в 2017 году в главных отраслевых журналах российской фармацевтики вышел целый цикл статей с рекомендациями по подбору самых различных моделей таблеточных прессов в соответствии с требуемыми техническими характеристиками и спецификациями, а также с учетом маркетинговых ожиданий в плане формы лекарственного средства от производителя. Впервые в рамках коллективной экспозиции «Город производителей» была представлена готовая продукция, полученная с помощью блистерных и деблистерных машин **O.M.A.R.**, а также новинка для российского рынка – лабораторная лиофильная сушилка **BUCHI Lyovapor™** с технологиями Infinite-Technology™ и Infinite-Control™, обеспечивающими превосходный контроль процесса и неограниченную емкость конденсора благодаря попеременной загрузке его камер при сушке пептидов и белков, аморфных и кристаллических продуктов, химических образцов на микротитровальных



планшетах или существенно больших по объёму растворах в колбах. Данная модель прекрасно подходит для различных видов контроля качества и лабораторного синтеза на стадиях R&D лекарственных средств, обеспечивая максимально высокий уровень сушки пептидов, белков, аморфных и кристаллических растворов. Традиционно швейцарский партнер ведущего химико-фармацевтического холдинга России представлял промышленный ротационный испаритель, но уже в модификации 2017 года – **R-220 Pro** с усовершенствованным мембранным насосом **V-600**, который стал новым стандартом в упаривании, сочетающим традиционную надёжность ротационных испарителей **BUCHI** с новейшими технологиями автоматизации процесса и современной эргономикой.

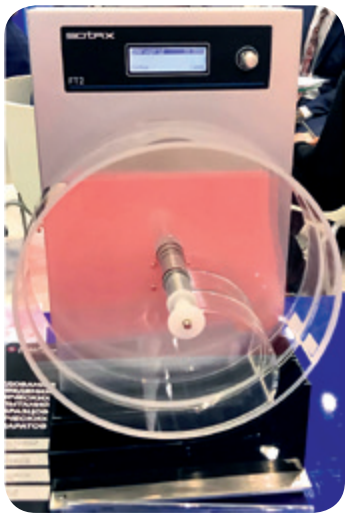


Что есть такого на «Pharmtech & Ingredients», что позволяет этой выставке оставаться № 1 среди конгрессно-выставочных мероприятий?

В период выставки на ряде отраслевых порталов появлялось множество материалов о ней, суть которых можно свести к одной фразе: по масштабности и популярности среди специалистов фармрынка это стало мероприятием № 1 в 2017 году. И это не просто слова. Например, где еще вам удавалось встретить за одним круглым столом ярчайших представителей трех самых успешных фармацевтических кластеров страны? Ответ очевиден: на круглом столе, посвященном контрактному производству фармацевтической продукции, который состоялся 22 ноября при поддержке ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт». Своим опытом по привлечению инвесторов и стимулированию контрактного производства в регионах поделились советник генерального директора по инвестициям АО «Корпорация развития Московской области» **Константин Волков** и исполнительный директор ассоциации «Калужский фармацевтический кластер» **Ирина Новикова**, а финансовый директор «Инфамед К» **Дмитрий Горохов**, представляя регион, который, по меткому выражению модератора **Александра Кузина** из «НоваМедика», производит BMW, рассказал, как живется производителям лекарственных средств в условиях бизнес-парка «Экобалтик» и особой экономической зоны. Более того, интерес к дискуссии по второму по популярности на фармрынке после маркировки вопросу (контрактное производство) подогрели и высокие гости из зала, не заявленные к участию в составе президиума, но от этого не менее активные. Так, генеральный директор Технопарка «НоваМедика Иннотех» **Александр Рудько** рассказал о том, какие Maserati готовы разрабатывать или производить на контрактной основе сотрудники R&D-лаборатории и пилотного производства Технопарка. [Подробнее о мероприятии читайте далее на страницах этого номера.]

Во второй день выставки состоялся и круглый стол по теме *«Маркировка лекарственных препаратов. Взгляд со стороны аптек»*, организованный СПФО, где были рассмотрены вопросы внедрения систем маркировки и существующий опыт аптечных и медицинских организаций, особенности выбора оборудования и программного обеспечения и многие другие практические вопросы.

Поскольку одним из ключевых вопросов контрактного производства является соответствие российского партнера европейским стандартам GxP и наличие на этих площадках знакомого иностранным инвесторам оборудования, нет ничего удивительного, что представители контрактных площадок были замечены на стенде ГК «Фармконтракт». Портфель поставляемого на российский рынок оборудования дистрибьюторского подразделения холдинга поражает своим размахом. Так, холдинг создал интригу для своих гостей, анонсировав представление систем растворения от швейцарского партнера **SOTAX**, о возможностях и принципах работы модульной системы **Xtend** которого продакт-менеджеры рассказывали во второй день выставки. Более того, здесь же рядом работал и тестер распадаемости **DT50**; был представлен уже в новом дизайне тестер истираемости табле-





ток **FT2**, который соответствует не только требованиям USP и EurPh, но и Государственной фармакопее РФ XIII издания.

Из новинок на стенде ведущего химико-фармацевтического холдинга России для биофармпроизводств был представлен проточный цитомер **CytoFlex** от Beckman Coulter, который позволяет измерить 13 параметров флуоресценции и 2 параметра светорассеяния.

Очевидно, что выставка 2017 года вышла на новый уровень в плане деловой программы: за три дня гости и участники ключевого события года успели обсудить самые злободневные вопросы – от маркировки и контрактного производства до узкоспециализированных аспектов процесса R&D лекарственных средств. Все мероприятия, по отзывам гостей выставки, прошли на самом высоком уровне и пользовались небывалым успехом. Отмечается и качественный рост посетителей выставочной экспозиции. Например, специалисты спонсора мероприятия, ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт», отметили, что почти 95% наиболее посещаемого стенда составили давно знакомые партнеры и клиенты, которые пришли на выставку к проверенному поставщику с целью проведения масштабирования своего производства либо обсуждения вопроса реконструкции (или модернизации) действующих еще с незапаметных времен производственных корпусов. Именно поэтому вот уже третий год подряд в рамках коллективной экспозиции ГК «Фармконтракт» представлены максимально приближенные к реальным условиям чистые помещения с функционирующим, как на настоящем производстве, технологическим оборудованием для таблетирования и упаковки произведенного продукта.

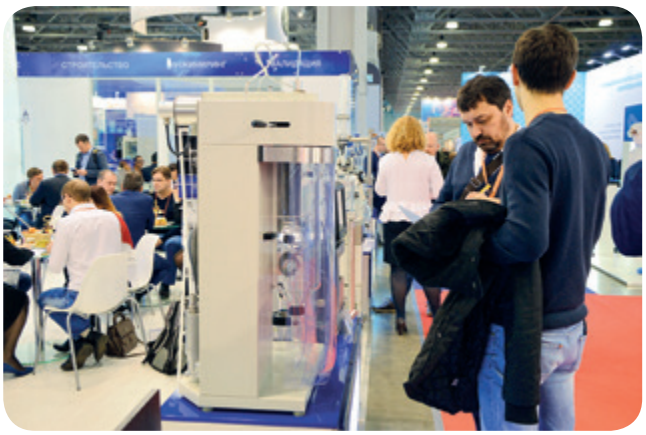
В то же время на «Pharmtech» приезжают, как правило, целыми командами от фармпредприятий: здесь можно встретить как топ-менеджмент высшего звена, так и главных технологов, начальников лабораторий и рядовых сотрудников ОКК одного фармзавода. Налицо комплексный подход со стороны производителей лекарственных средств к выбору поставщика, специализирующегося на проектах «под ключ». Напомним, что первыми на российском рынке такой подход предложили в ГК «Фармконтракт», консолидировав в системе «одного окна» высококвалифицированную команду проектировщиков и ряд дистрибьюторских подразделений, которые возглавляют бывшие практики в области производства готовых лекарственных средств, синтеза субстанций и организации выпуска биофармпродуктов с нуля. Наверное, это и является причиной успеха команды профессионалов, в активе которой гремящие на всю Россию проекты: полномасштабная реконструкция старейшего завода «Биохимик» с последующей поставкой технологического оборудования для выпуска готовых лекарственных средств и активных фармацевтических субстанций, а также аналитического оборудования для обеспечения контроля качества, от входного контроля сырья до проверки качества произведенного продукта; создание нового производственного комплекса для синтеза фармацевтической субстанции методом тонкого органического синтеза с производительностью порядка 10 тыс. тонн в год – «Инфамед К»; лабораторный инжиниринг технологического центра «НоваМедика», оснащением которого занимался отдел лабораторного оборудования холдинга; организация участка для наработки опытно-промышленных партий активных фармацевтических ингредиентов в Центре трансфера технологий ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, куда были поставлены и успешно функционируют реакторные установки **BUCHI AG** и **Buchiglasuster**, системы термостатирования **Julabo Presto**, и т.д. Большинство приборов, которые легли в основу воплощенных для данных объектов решений, были представлены в рамках коллективной экспозиции «Город производителей». В частности, можно было увидеть хорошо знакомые, но в обновленной версии модели: термостат-инкубатор с охлаждением **BINDER KT 115**, отличающийся эффективной дезинфекцией при 100 °С, и климатическую камеру **BINDER KBF 115** для стрессовых испытаний, которая сейчас доступна в комплектации с системой водоподготовки. Кстати, данные климатические камеры и инкубаторы, позволяющие моделировать условия окружающей среды, пользуются признанием в тех же «Красногорсклексредствах».

Поражал своей обширностью и ряд представленного весового оборудования от японских производителей **VIBRA** и **A&D**, американского производителя **Ohaus**. Это аналитические весы с высокой степенью точности **VIBRA HT 224RCE** с автоматической калибровкой Se-CAL, обеспечивающей точность измерения через заданные интервалы времени и при перепадах температуры окружающей среды; лабораторные весы **VIBRA AB 1202 RCE** на базе запатентованного датчика Tuning fork, который обеспечивает стабильность и устойчивость прибора к электромагнитным помехам и быстрый отклик при

измерении; единственные в своем роде весы **VIBRA FZ 15000 Ex-i03**, которые могут быть использованы даже в тех зонах, где неизбежно возникновение или присутствие взрывоопасных смесей и газов; микровесы I класса точности с внутренней калибровкой **A&D BM-22**, имеющие дискретность 0,001/0,01мг; автоматические полумикровесы Ohaus серии Explorer – **EX125** с дискретностью 0,00001 г.

«Pharmtech & Ingredients» – место рождения Лиги женщин-руководителей

Вопросам места и роли прекрасного пола в бизнес-структурах и органах власти сегодня уделяется повышенное внимание не только в России, но и во всем мире. Потому такой мейнстрим не мог остаться незамеченным и в одной из самых «женских» отраслей промышленности – фармацевтике. Так, 23 ноября состоялся круглый стол *«Возможности развития фармацевтической промышленности России – взгляд женщин-руководителей»*, участниками которого стали женщины – генеральные директора фармацевтических заводов и компаний, собственники фармбизнеса, коммерческие директора, члены советов директоров компаний: генеральный директор завода «Красфарма» **Наталья Новичкова**, председатель совета директоров компании «ВЕЛФАРМ» **Людмила Щербакова**, генеральный директор Ирбитского химико-фармацевтического завода **Людмила Солодухина**, директор выставки «Pharmtech & Ingredients» **Наталья Васильева** и другие женщины-руководители. В работе круглого стола приняли участие член Совета Федерации Федерального Собрания РФ **Елена Перминова** и заместитель директора департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Елена Денисова**. Собравшиеся обсудили широкий круг вопросов: взаимодействие с международными организациями и объединениями для продвижения российской продукции на внешние рынки, в том числе и посредством программ женского лидерства и предпринимательства, использование платформ электронной коммерции, перспективы создания Лиги женщин-руководителей фармотрасли и другие.



Старые добрые проекты

Безусловно, специфика конгрессно-выставочной индустрии такова, что каждый год организаторам приходится выдерживать жесточайшую конкуренцию за посетителя – целевую аудиторию. Именно поэтому оргкомитеты всех отраслевых мероприятий стараются предложить максимум новых возможностей и форматов событий, посвященных обсуждению самых топовых вопросов. Нередко такая погоня за новизной отодвигает на второй план проверенные временем и все еще (пусть и в меньшей степени) популярные мероприятия. Например, в рамках выставки «Pharmtech & Ingredients» такая участь постигла международный форум *«Фармтехпром»*, который в этом году объединил лишь чуть более 300 делегатов, несмотря на вполне интересные тематические сессии о сырье, ингредиентах, технологиях и оборудовании для фармацевтического производства, упаковочных материалах, а также сопутствующих процессах фармпроизводства.

Традиционно в рамках выставки «Pharmtech & Ingredients» проходил образовательный проект «Pharmtech Tutor», целью которого является получение практических навыков студентами профильных специальностей фармацевтических образовательных учреждений. При содействии ведущих мировых компаний из числа участников выставки 66 студентов из 8 вузов России прошли мини-стажировку во время выставки. По итогам работы проекта состоялся круглый стол *«Развитие регуляторной системы России в сфере обращения ЛС – текущие тенденции и новые вызовы; перспективы трудоустройства молодых специалистов в области промышленной фармации и в регуляторной системе страны»*. Модераторами круглого стола выступили заместитель руководителя образовательного центра по учебной работе ФБУ «ГИЛС и НП» **Владимир Орлов** и заведующий кафедрой фармацевтической технологии института фармации и трансляционной медицины Первого МГМУ им. Сеченова д.ф.н., профессор **Иван Краснюк**. Такое внимание к будущему потенциалу российского фармпрома позволяет надеяться, что проект «Pharmtech Tutor» станет хорошим трамплином и тем «рыбным местом», где крупные игроки фармацевтического бизнеса «отлавливают» квалифицированные кадры.

В 2018 году 20-я юбилейная Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech & Ingredients» будет проходить с 20 по 23 ноября в МВЦ «Крокус Экспо».

Материал подготовлен при помощи пресс-служб Группы компаний ITE и ГК «Фармконтракт».

КРУГЛЫЙ СТОЛ «КОНТРАКТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО»

22 ноября 2017 года на площадке выставки «Pharmtech & Ingredient» прошел круглый стол, посвященный второй самой обсуждаемой теме ушедшего года после маркировки – контрактному производству лекарственных средств. Напомним, что мероприятие проходило в период внесения на рассмотрение в Государственную Думу Российской Федерации соответствующих поправок в закон «Об обращении лекарственных средств», которые были приняты в первом чтении 19 января 2018 года. Организаторами одного из самых востребованных в деловой программе выставки мероприятия выступили Группа компаний ITE и ГК «Фармконтракт». Модератором круглого стола стал генеральный директор «НоваМедика» Александр Кузин.



Жаркие дискуссии и море вопросов, которые сопровождали поправки в закон «Об обращении лекарственных средств», обусловили выбор «первооткрывателя» круглого стола: руководитель отдела инспектирования производства лекарственных средств ФБУ «ГИЛС и НП» **Наталия Чадова** не только рассказала о хитросплетениях в организации контрактного производства за рубежом, рисках для качества конечного продукта, но и представила эксклюзивную статистику, которую институт подготовил для Минпромторга России, выступившего инициатором указанных поправок. По мнению эксперта, контрактное производство (на чужих мощностях с оговоренными условиями полного соблюдения технологии и контроля качества продукции заказчика) – важный элемент сотрудничества в современных условиях. «В ценах отгрузки оно составляет порядка 23 млрд руб. При этом 80% – это заказы иностранных компаний на размещение производства на российских площадках. Остальные 20% приходятся на взаимодействие российских компаний с отечественными же игроками. На уровне корпораций 67 зарубежных компаний в первой половине 2017 г. разместили производство своих препаратов в России на 31 производственной площадке. Доля первой пятерки составляет 62% – достаточный показатель, но при этом не такой высокий, как аналогичный уровень у компаний, размещающих у себя контрактное производство (85% объема приходится на первую пятерку). Получается, что спрос на данный момент превышает предложение» (рисунок 1). В качестве альтернативного варианта **Наталья Чадова** указала покупку готовой компании или строительство с нуля. Возвращаясь к статистике, эксперт заметила, что «почти 20% производственного объема в первом полугодии 2017 г. пришлось на локализованные продукты, треть из них изготовлена на собственных мощностях компаний в РФ».



Рисунок 1. Контрактное производство в России (данные за первое полугодие 2017 года)

От аналитиков слово перешло к практикам, которые не понаслышке знают, какие проблемы возникают у фармзаводов, внедряющих в свою работу контрактное производство. Исполнительный директор самого известного не только в России, но и далеко за ее пределами Калужского фармацевтического кластера **Ирина Новикова** отметила, что в регионе, где действует режим особой экономической зоны, широко развито внутрикластерное взаимодействие, которое нередко превращается в контрактное производство: «Мы не только поддерживаем внешнее контрактное производство, но и выступаем за развитие внутренней кооперации. И это уже привело к важным партнерским проектам между участниками кластера». Среди таких примеров можно отметить взаимодействие Hemofarm и «Ниармедик Фарма», mirpharm и STADA, mirpharm и «БИОН», ГНЦ РФ – ФЭИ и НИФХИ имени Карпова. Контрактное производство за пределами кластера ведется «ФПК «Фармвилар», «Сотекс», «Канонфарма Продакшн», Valenta и «Фармстандарт» в области производства твердых лекарственных форм, лекарственных средств в саше, мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов), шипучих таблеток, активных фармацевтических субстанций и премиксов. Также среди примеров контрактного производства за пределами кластера были названы взаимодействия mirpharm и Valenta, «БИОН» и Veropharm, Berlin-Chemie и MERZ.

Обзор возможностей фармпроизводителей, расположившихся в кластерах, продолжил представитель региона, вот уже какой год гостеприимно принимающего на своей территории выставку «Pharmtech & Ingredients», советник генерального директора по инвестициям Корпорации развития Московской области **Константин Волков**. Как мы знаем, важнейшим элементом инвестиционной инфраструктуры региона являются промышленные площадки с особым статусом: в Московской области действует ряд индустриальных парков, особых экономических зон и технопарков (по данным, которые представил эксперт, в 2016 году в действие были введены 15 индустриальных парков, к 2018 году их станет 70; в области 3 особых экономических зоны). Более того, согласно данным Минпромторга России, Московская область является лидером по количеству индустриальных парков и особых экономических зон в России. Только в 2017 году индустриальный парк «Рио-Индастриал» (Пушкинский м.р.) и «Шереметьево» (г.о. Химки) прошли процедуру аккредитации в Минпромторге России на соответствие всем требованиям в целях применения к ним мер стимулирования деятельности в сфере промышленности (ПП РФ №794). Все это обуславливает присутствие уже сегодня в регионе 26 крупных фармацевтических площадок: BIOCAD, «Канонфарма Продакшн», KRKA, МТЛ, ЗиО «Здоровье», Akrikhin, Valenta, Gedeon Richter, «Эйлитон», «Гекса» и других, обеспечивающих выпуск фармацевтической продукции до 12% от общероссийского объема и до 50% объема фармпрепаратов, выпускаемых на территории ЦФО. Причины выбора в качестве места локализации собственной площадки, а также работы с компаниями, которые расположились в непосредственной близости от финансового центра России, **Константин Волков** видит в правильной организации работы с инвесторами. Так, в регионе действует, помимо федерального СПИКа, еще и региональный инвестиционный контракт. К тому же благодаря работе КРМО, задачей которой является обеспечение взаимодействия частных инвесторов и государственных структур при реализации инвестпроекта, по принципу «одного окна» инвестор, обращаясь в Корпорацию, по сути, обращается сразу во все государственные структуры, которые участвуют в инвестпроекте. «Команда КРМО проконсультирует его по всем вопросам и направлениям, связанным с проектом, – пояснил **Константин Волков**. – В соответствии с заявкой инвестора специалисты Корпорации подбирают оптимальную промышленную площадку. КРМО проводит согласование проекта с муниципалитетами и областным правительством. КРМО предоставляет информацию о мерах поддержки, которые инвестор может получить в Подмосковье. При необходимости КРМО оказывает содействие в переговорах с госструктурами, которые привлекаются к реализации проекта. Таким образом, КРМО создает условия для максимально комфортной реализации инвестпроекта». В результате такого эффективного сотрудничества происходит запуск производства, выход на российских рынок.

После бурной дискуссии между представителями кластеров, к которой подключились и молодые кадры, озабоченные поиском работы на фармпредприятиях, **Александр Кузин** попросил передать микрофон от тех, кто производит «мерседесы» и «фольксвагены» к тому, кто производит BMW.

Представитель еще одной особой экономической зоны, которая первой озаботилась вопросом продления своего особого статуса [согласно российскому законодательству каждая особая экономическая зона создавалась на определенный срок, после чего льгот-



ные положения должны были быть прекращены, и, по сути, нынешние территории, которые приобретали данный статус в 1990-е годы, уже должны жить в рамках обычного налогового законодательства – *прим. ред.*], а именно Калининградской области, финансовый директор «Инфамед К» **Дмитрий Горохов** рассказал о том, как сами участники таких территорий оценивают перспективы контрактного производства.

Несмотря на то, что фармацевтический сектор в индустриальном бизнес-парке «Экобалтик» начинает только осваиваться, тот размах, с которым происходит создание производственного комплекса по выпуску фармацевтических субстанций, растворов, мазей, фармацевтических распылителей и даже складских комплексов в соответствии с международными стандартами GDP, позволяет рассматривать эти площади (средняя производственная площадь указанных участков 1 000 м^2) как потенциальные контрактные площадки, расположенные вблизи от европейских партнеров и создаваемые изначально по европейским стандартам GxP. Например, цех производства фармацевтических субстанций, создаваемый ГК «Фармконтракт» по заказу «Инфамед К», спроектирован в полном соответствии с международными стандартами GMP и прошёл квалификацию в ЕС. Производство оснащено самым современным высокотехнологичным оборудованием швейцарской фирмы BÜCHI, универсальность которого позволяет производить на нём и другие фармсубстанции по контракту. «Собственное производство субстанции и изготовление на её основе высокоэффективных антисептиков рассматривается «ИНФАМЕД К» как процесс импортозамещения и фактор фармбезопасности страны, предусмотренные программами развития фармацевтической отрасли России. В будущем планируется осуществить валидацию цехов завода на соответствие стандартам FDA, что позволит в рамках одного производственного объекта осуществлять производство лекарственных средств для заказчиков как из России, так и Европы и США».

Взгляд самих производителей лекарственных средств на проблему готовности к приему заказов на контрактной основе от своих партнеров и опыт такой кооперации представили генеральный директор АО Рафарма» **Владимир Ильюшин** и исполнительный директор ГК «ПИК-ФАРМА» **Галина Ким**. Так, на одном из предприятий ГК «ПИК-ФАРМА» – ООО «ПИК-ФАРМА ЛЕК», производящем жидкие лекарственные формы, существуют следующие перспективы контрактного производства, мощности которого могут составить до 70% или 350 млн таблеток и 70 млн капсул в год: в первом квартале следующего года планируется запуск участка по производству нестерильных жидких форм во флаконы объемом 25, 50, 100, 150 и 250 мл, свободные мощности под контрактное производство позволят выпускать до 10 млн флаконов в год. Уже сегодня контрактное производство группы компаний представлено такими услугами в сфере высокотехнологического производства твёрдых и жидких лекарственных средств, как

- разработка новых форм и продуктов;
- разработка и адаптация технологий;

- разработка ФСП и другой документации;
- наработка образцов для регистрации и клинических исследований;
- прессование таблеток;
- наполнение капсул;
- приготовление растворов, сиропов и др.;
- блистерование, розлив ЖЛФ;
- упаковка продукции в пачку с инструкцией;
- ускоренное и/или долгосрочное хранение продукции;
- оказание услуг по регистрации препаратов;
- содействие в организации доклинических и клинических исследований.

Говоря об этапах запуска проектов по контрактному производству, **Галина Ким** отметила, что ориентировочные сроки и затраты на запуск «идеального» проекта (несложный по технологическим характеристикам препарат) составляют 1,5 года и 2,6 млн рублей (рисунки 2 и 3).

Среди сложностей, с которыми сталкиваются отечественные заводы, стремящиеся к привлечению партнеров на свои контрактные площадки, спикер отметила технологические, технические и экономические сложности, сложности снабжения, регистрационного и юридического характера, в том числе вопросы конфиденциальности, интеллектуальной собственности и т.д. Так, инвестиции Заказчика – закупка форматных частей на текущее оборудование (под нужные Заказчику размеры упаковки) – может составить свыше 35 тыс. евро.





Рисунок 2. Этапы запуска проектов по контрактному производству



Рисунок 3. Этапы запуска проектов по контрактному производству во временном и финансовом выражении

Генеральный директор «Рафарма» **Владимир Ильюшин**, говоря о производственных возможностях холдинга, выпускающего обширный ассортимент лекарственных форм (таблетки, капсулы, мази, гели, антибиотики, твердые, жидкие и порошкообразные лекарственные средства), отметил не только готовность предложить избыточные производственные мощности для контрактного производства, но и то обстоятельство, что сегодня в «стране полным-полно контрактных площадок – Заказчики могут выбирать».

Живая дискуссия и море вопросов не только от участников круглого стола, но и из зала, а также принятие парламентом России поправок в законопроект «Об обращении лекарственных средств», которые касаются контрактного производства, предоставляющего, по словам замминистра промышленности и торговли РФ **Сергея Цыба**, возможность производителям, осуществляющим выпуск лекарственных средств за пределами Российской Федерации, в случае отсутствия у них заключения о соответствии требованиям и правилам надлежащей производственной практики, представлять копию решения уполномоченного федерального органа исполнительной власти о проведении инспектирования иностранного производителя, – все это позволяет ожидать продолжения дискуссии на новом уровне в следующем году. Тем более, что к ноябрю производители смогут оценить, насколько регистрация лекарственных препаратов с одинаковым МНН, но с различными торговыми наименованиями, произведенных на одной площадке, оказалась эффективной в плане снижения нагрузки на них и сокращения временных рамок доступа новых препаратов на национальный рынок.

СЕМИНАР «РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

23 ноября 2017 года в рамках выставки «Pharmtech & Ingredients» состоялся традиционный семинар, связанный с различными аспектами разработки и регистрации лекарственных средств: от особенностей функционирования и изменения правил работы испытательных лабораторий в связи с вступлением в силу в России стандартов GLP до комплексных решений автоматизации разработки лекарственных препаратов. Впервые в рамках мероприятия представителями производственных площадок были представлены не только опыт и рекомендации по организации фармдеятельности в соответствии со всеми GxP-стандартами, но и практические аспекты применения экструзии на фармацевтическом производстве.





Деятельность исследовательской фармацевтической лаборатории в условиях единого фармацевтического рынка ЕАЭС, элементный анализ в фармацевтических лабораториях в соответствии с современными требованиями USP/ICH и национальным законодательством, регуляторные аспекты в области клеточной терапии, общая стратегия разработки технологического процесса для биофармацевтического производства – эти и многие другие вопросы, с которыми сопряжен процесс R&D, постоянно находятся в тренде и под пристальным вниманием специалистов, деятельность которых связана с производством и выводом на рынок востребованных всем населением продуктов – лекарственных средств. Именно поэтому ежегодные тематические семинары, организованные отраслевым СМИ (*«Разработка и регистрация лекарственных средств»*) и крупнейшим национальным дистрибьютором в России *ГК «Фармконтракт»,* пользуются популярностью у сегмента b2b.

«Проведение семинаров в рамках деловой программы выставки «Pharmtech & Ingredients» стало хорошей традицией, – отмечает заместитель генерального директора по маркетингу и PR ГК «Фармконтракт» **Евгения Дорина**. – В прошлом году это было мероприятие, посвященное узкоспециализированным вопросам, волнующим производителей биофармпродуктов. В этом году тематика семинара гораздо шире. Более того, успех любого мероприятия во многом зависит от разумного сочетания теории и практики, чего, собственно, и удалось нам достичь благодаря приглашению поделиться опытом в области экструзии в фармацевтическом производстве и исследований совместимости и стрессовых исследований в области разработки лекарственных средств коллег из «НоваМедика», доклады которых были удачно дополнены с точки зрения готовых решений прикладных задач производителей лекарственных средств от производителей оборудования для фармпредприятий. Наверное, сегодня редко у кого можно встретить столько компетенций и вариантов нестандартных подходов к организации биофармпроизводств, причем в строгом соответствии с современным российским законодательством».

Открыл семинар генеральный директор ЦФА, главный редактор научно-производственного журнала *«Разработка и регистрация лекарственных*

средств» д.фарм.н. **Игорь Шохин**, который познакомил участников с основными новеллами евразийского законодательства. Согласно утвержденным правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств ЕАЭС процедура «биовейвер» – принципиально новый аспект руководства! Это процедура оценки биоэквивалентности для 1 и 3 класса БКС воспроизведенного лекарственного препарата без проведения исследования *in vivo*. В то же время процедура имеет ряд ограничений, которые надо индивидуально рассматривать для каждого лекарственного средства.

Директор по производству Технологического центра «НоваМедика Иннотех» к.фарм.н. **Юлия Обидченко** рассказала о практических аспектах экструзии в фармацевтическом производстве, которая применяется в композициях с модифицированным высвобождением (кишечнорастворимое высвобождение с использованием pH-зависимых растворимых полимеров и матрица с замедленным высвобождением), для маскирования горького API (встраивание API в растворимый полимер) и стабилизации API (защита API от влажности и кислорода).

При этом спикер обратила внимание, что данный метод используется в фармтехнологии относительно недавно, с 1980-х годов, и имеет как свои преимущества, так и недостатки. Среди первых – непрерывность процесса (экономически эффективный, с небольшими вариациями от партии к партии, простота масштабирования), возможность проводить различные процессы на одном этапе (смешивание, замешивание, уменьшение размера частиц, диспергирование, формование), а также отсутствие воды и какого-либо органического растворителя. К недостаткам относятся требование термически стабильных API, возможность сокращения времени пребывания до ~15 с и уменьшение температуры добавлением пластификаторов (<Tg). В качестве вспомогательных веществ для горячей экструзии используются такие носители, как полимеры и сополимеры (Eudragit® / BASF); PVP-, PVP-VA-сополимер, PVA-, PVA-PEG-сополимер; PVAc, PVAc-PEG-ПВХапролактамный сополимер (Soluplus®); на основе целлюлозы (MC, HPMC, HPMC-P...); биодеградируемые полимеры (например, полимолочная кислота); сахара, олиго-/полисахариды, сахарные спирты; а также

- пластификаторы: PEGs, полоксамеры, TEC;
- лубриканты: липиды (например, гидрированные масла) и воски (например, GMS);
- поверхностно-активные вещества, модификаторы pH, стабилизаторы.

Обзор возможностей для разработчиков и производителей клеточных продуктов представила продакт-менеджер Beckman Coulter Life Sciences **Ирина Кошеленко**.

Следующий докладчик, генеральный директор Технологического центра «НоваМедика Иннотех» **Александр Рудько**, рассказал об особенностях исследования совместимости и стрессовых исследованиях в области разработки лекарственных средств. Прежде всего спикер обратил наше внимание на дихотомию понятий.

- **Стрессовые испытания активной фармацевтической субстанции (stress tesLng of the API)** – испытания, проводимые для выяснения характеристик стабильности, свойственных активной фармацевтической субстанции. Такие испытания являются частью стратегии разработки и, как правило, проводятся при более неблагоприятных условиях, чем условия ускоренных испытаний.
- **Стрессовые испытания лекарственного препарата (stress tesLng of the medicinal product)** – испытания, проводимые для оценки влияния более неблагоприятных условий хранения на лекарственный препарат. Они включают испытания светостабильности и параметров, специфических для определенных лекарственных форм.

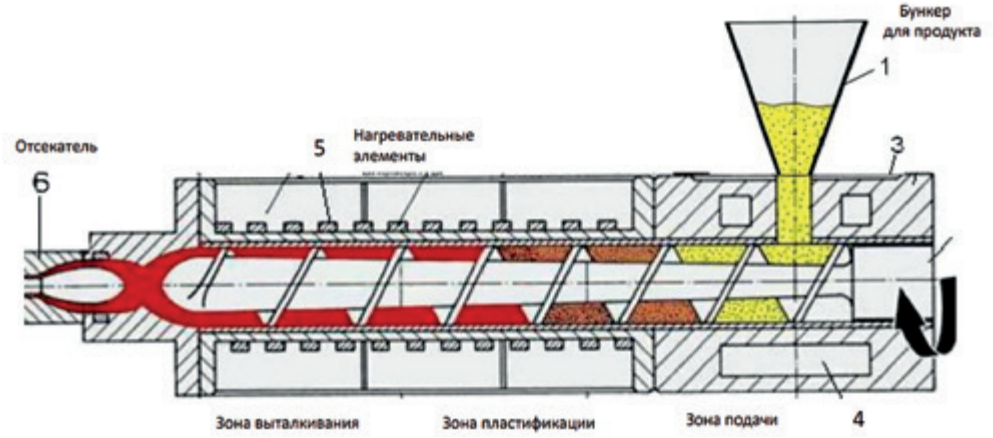


Рисунок 1. Экструзия горячим расплавом в фармацевтической технологии

Поскольку целью стрессовых испытаний АФС является получение первичных данных об изменении качества лекарственных средств во времени под влиянием различных факторов окружающей среды и получение данных по продуктам разложения при разработке раздела «Посторонние примеси», а также выбор материала первичной упаковки и разработка требований к условиям хранения лекарственных средств, непосредственно стрессовыми факторами будут выступать свет, температура, влажность, окислители и гидролиз кислотой/основанием. При выборе конкретного стрессового фактора исследователю следует доказать с помощью соответствующих методов, что воздействие данного фактора не приводит/приводит к недопустимым изменениям. Например, при систематическом изучении светочувствительности проводятся следующие испытания:

- испытания активной фармацевтической субстанции;
- испытания лекарственного препарата без первичной упаковки;
- испытания (при необходимости) лекарственного препарата в первичной упаковке;
- испытания (при необходимости) лекарственного препарата в торговой упаковке.

Говоря об исследовании совместимости, которое проводится с целью получения информации о возможном взаимодействии лекарственных веществ между собой и со вспомогательными компонентами, входящими в одну лекарственную форму, исследователи, как правило, руководствуются двумя стратегиями – перспективным или ретроспективным исследованием. Если первый вид работ проводится, когда состав лекарственного препарата не определен и необходимо установить наиболее инертные вспомогательные вещества по отношению к фармацевтической субстанции или возможность присутствия двух или более раз-



Рисунок 2. Комплексный подход к изучению стабильности



ных ФС в одном ЛП, то второй проводится с целью подтверждения состава лекарственного препарата или выявления веществ, оказывающих негативное влияние на его качество.

Приведя пример из практической деятельности центра «НовоМедика Иннотех», **Александр Рудько** резюмировал, что исследования совместимости и стрессовые исследования являются частью дизайна продукта и носят относительный характер, поэтому должна быть выбрана точка (образец), относительно которой проводят сравнение. Смотрятся не абсолютные значения, а тенденции. В этой связи особую роль имеет интерпретация полученных данных.

Руководитель отдела фармакологических исследований ИЦ «ОЛФАРМ» **Богдан Крапивин** в рамках анализа с практической точки зрения особенностей работы независимого испытательного центра по российским стандартам GLP отметил, что среди большинства сотрудников лабораторий существует ряд мифов в отношении требований к виварию, которые предъявляет указанный стандарт. Среди них:

- GLP не требует квалификации (валидации) помещений.
- Нет рекомендаций по классификации чистоты воздуха.
- Нет специфических рекомендаций по потокам персонала, отходов, материалов, образцов.
- Нет специфических рекомендаций по обеззараживанию помещений (исследования *in vitro*).
- Нет рекомендаций по канализации, водоснабжению, сварке.
- Нет требований об охранном доступе в виварий.
- Температуру и влажность можно не контролировать, если нет такой необходимости в рамках текущих задач.

В то же время при работе с животными у лабораторного комплекса должны быть СОП по карантиниро-

ванию, приему, осмотру; процедура выведения из карантина, формирования групп; должен проводиться мониторинг здоровья животных; соблюдаться правила санитарии и чистота; проводиться маркировка животных, периодический мониторинг кормов и воды. Есть особые требования и к оборудованию, образцам и реактивам. Так, на каждую единицу оборудования должны быть периодическая поверка/калибровка, очистка, СОПы по использованию, калибровке и обслуживанию, записи о проделанных работах (Logbook).

Образцы и реактивы.

- Промаркированы (наименование, концентрация, условия и сроки хранения).
- Хранятся в надлежащих условиях.
- Исключено использование просроченных реактивов.
- Использование реактивов должно быть документировано.
- Нет требования о предварительном контроле реактивов.
- Каждый исследуемый и контрольный образец должны иметь информацию о стабильности, чистоте, растворимости и т.д.

Специалист по оборудованию BUCHI, Russia/CIS **Иван Коваленко** познакомил участников семинара с новинками швейцарского производителя в области оптимизации лабораторных процессов сушки. [Подробнее о методах сушки и концентрирования читайте на С. 308–314.]

Заметим, что BUCHI Labortechnik AG в 2017 году удивлял как зарубежный, так и отечественный рынок практически ежеквартальными новинками. Ещё накануне 2017 года компания представила новую модификацию промышленного ротационного испарителя R-220 Pro с усовершенствованным мембранным насосом V-600 и циркуляционный охладитель F-325. Эта система, по сути, стала новым стандартом в упаривании, сочетающим традиционную надёжность ротационных испарителей BUCHI (в 1958 году именно эта компания изготовила первый в мире «ротор») с новейшими технологиями автоматизации процесса и современной эргономикой. Еще одной новинкой 2017 года от BUCHI AG стало второе поколение распылительных сушилок Nano Spray Dryer B-90 HP, отличающихся, по словам **Ивана Коваленко**, повышенной производительностью и позволяющих получать на выходе частицы с размером в диапазоне от 200 нм до 5 мкм с минимальными потерями образца. Особое внимание спикер обратил на новую лабораторную лио-



Рисунок 3. Основные методы лабораторного высушивания от BUCHI Labortechnik

фильную сушилку Lyovapor™ с технологиями Infinite-Technology™ и Infinite-Control™, обеспечивающими превосходный контроль процесса и неограниченную емкость конденсора благодаря попеременной загрузке его камер при сушке пептидов и белков, аморфных и кристаллических продуктов, химических образцов на микротитровальных планшетах или существенно больших по объёму растворах в колбах. Данная модель, которую докладчик пригласил осмотреть на стенде официального партнера компании, ГК «Фармконтракт», прекрасно подходит для отработки процессов пищевой отрасли, где крайне важно удалить растворитель без разрушения полезных веществ (белков, минералов, витаминов).

Руководитель отдела биотехнологического оборудования ГК «Фармконтракт» к.б.н. **Алексей Бобрускин**[1] представил правила общей стратегии разработки технологического процесса для биофармацевтического производства. Поскольку стратегия требует ответа на ряд вопросов, спикер начал свое выступление с определения самого понятия «биопроцесс», под которым понимается упорядоченная последовательность взаимосвязанных подпроцессов с использованием в начале процесса природных или генетически модифицированных микроорганизмов / культур кле-

[1]На момент выхода номера данного журнала уже экс-руководитель.

ток / тканей животных и растений для производства ценных лекарственных препаратов:

- ДНК (препараты для генной терапии и лечения инфекционных заболеваний).
- Белки (антитела, интерфероны, ферменты, ТПА, гирудин, интерлейкины и т.д.).
- Гормоны (инсулин, гормон роста, Г-КСФ, ЭПО, ФСГ и т.д.).

«Основой разработки биопроцессов является внутреннее ощущение и осознание перехода от лаборатории к производству, которое предполагает стремление к тщательному поиску условий, наиболее благоприятствующих оптимальному производству, и дублирование этих условий при увеличении производства», – отметил **Алексей Бобрускин**. Важным требованием к биопроцессу является то обстоятельство, что при переходе на большие объемы основные параметры процессов должны сохраняться.

Говоря о практических аспектах биопроизводства на разных стадиях, биотехнолог с большим практическим опытом работы в области производства биопродуктов представил обзор оптимального для каждого из этапов оборудования. Так, на первом этапе, где происходит выделение и очистка целевого продукта, могут быть задействованы колонны и хроматографические системы.

В целом описанный алгоритм разработки биопроцесса может быть представлен следующими шагами.

- Выбрать вид хроматографии.
- Подобрать сорбент и начальные физико-химические параметры подвижной фазы: pH, состав. Оценивают полную ДЕ сорбента и потери белка на стадиях сорбции и десорбции.
- Подобрать размер гранул сорбента. Оценивают разрешающую способность и потери белка на стадиях сорбции и десорбции.





Рисунок 4. **Этап выделения и очистки целевого продукта**

- Сравнивают сорбенты одного типа, разных производителей.
- Подбирают окончательные параметры процесса: максимальную загрузку, объем элюента, линейную скорость. Оценивают разрешающую способность, потери белка на стадиях сорбции и десорбции и время, затраченное на процесс.

Подбирают высоту столба сорбента. Оценивают линейную скорость (должна быть неизменной), время, затраченное на процесс, разрешающую способность и потери белка на стадиях сорбции и десорбции.

Таким образом, в биопроцесс должны быть интегрированы процессы, учитывающие все детали для обеспечения количества и качества продукта. Более того, необходим целостный подход к проектированию биопроцесса и качественный дизайн технологии с наименьшим количеством экономически выгодных шагов.

Завершился семинар докладом менеджера по работе с партнерами Agilent Technologies к.х.н. **Василия Баклыкова** об элементном анализе в фармацевтических лабораториях в соответствии с современными требованиями USP/ICH, выдержки из которого мы публиковали в материалах партнерских статей в прошлом году.



BÜCHI
SWITZERLAND

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

Pharmcontract®
group of companies

www.buchi.ru/lyovapor

Quality in your hands

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С ПРИНЦИПАМИ НАДЛЕЖАЩИХ ПРАКТИК GxP

29 ноября 2017 г. в АО «Технопарк Слава» состоялась вторая научно-практическая конференция с международным участием, посвященная актуальным вопросам разработки и регистрации лекарственных средств по надлежащим GxP-стандартам. Ведущие специалисты отечественного фармрынка также обсудили особенности работы в условиях единого рынка ЕАЭС: деятельность исследовательской фармацевтической GLP-лаборатории; исследования биоэквивалентности и сравнительного теста кинетики растворения по наднациональным требованиям; особенности мониторинга исследования биоэквивалентности и проведения исследования биоэквивалентности лекарственных средств в разных лекарственных формах и с модифицированным высвобождением.



Проведение GLP-сертифицированным лабораторным центром ЦФА и ГК «Фармконтракт» совместного мероприятия для специалистов фармацевтической отрасли по ключевым надлежащим практикам с учетом особенностей российского, наднационального и международного законодательств стало хорошей традицией. В этом году конференция прошла в формате тематических секций, на которых обсуждались общие вопросы надлежащих практик, специфика исследований биоэквивалентности и проведения теста «Растворение», а также применение иных аналитических методик в R&D-процессе.

Первая секция мероприятия («Общие вопросы надлежащих практик») была открыта докладом главного редактора научно-производственного журнала *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* д.фарм.н. **Игоря Шохина**, который поделился опытом организации деятельности исследовательской фармацевтической GLP-лаборатории в условиях единого рынка ЕАЭС. Спикер отметил, что утвержденные новые документы ЕАЭС (по валидации аналитических методик и по исследованиям биоэквивалентности лекарственных средств) должны стать руководящими стандартами исследовательских лабораторий. Далее начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации ЕАЭС к.м.н. **Дмитрий Рождественский** представил доклад на тему: *«Исследования биоэквивалентности и сравнительного теста кинетики растворения согласно требованиям ЕАЭС»*. **Дмитрий Анатольевич** детально прокомментировал требование нового регуляторного документа стран Евразийского экономического союза, в том числе особенности проведения процедуры «биовейвер» (оценка эквивалентности лекарственных средств в условиях *in vitro*). Более того, спикер обратил внимание, что в классификации лекарственных препаратов с точки зрения регистратора существует такой тип, как «бабушкины» лекарства («Grandma-Drug»). К таким лекарственным препаратам относятся:

- лекарственные препараты с хорошо изученным применением – эффективность и безопасность молекулы признаны на основе пострегистрационных или эпидемиологических КИ, опыт обращения составляет более 10 лет не менее чем в 3 государствах
- лекарственные растительные препараты – содержат в качестве АФИ лекарственное растительное сырье либо продукты его переработки
- гомеопатический лекарственный препарат – произведен из гомеопатического сырья по гомеопатической технологии.

Среди правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках ЕАЭС Дмитрий Рождественский обратил внимание участников конференции, что им необходимо представить официальное письмо, подписанное уполномоченным лицом по качеству производителя и подтверждающее, что количественный состав и производство исследуемого препарата идентичны количественному составу и производству лекарственного

препарата, заявленного на регистрацию. А говоря о возможностях подтверждения эквивалентности генерических лекарственных препаратов, спикер привел следующую таблицу:

Вид исследования по подтверждению	Описание применимых случаев
Исследование по процедуре «биовейвер» *in vitro* (приложения 4 и 5 Правил проведения исследований биоэквивалентности)	ЛП, не являющиеся пролекарствами, относящиеся к I и III классам БКС при условии, что они быстро (I БКС) и очень быстро растворимы (I и III БКС)
Исследование фармакокинетической биоэквивалентности (основной текст и приложение 1 Правил проведения исследований биоэквивалентности)	ЛП для приема внутрь в твердых формах немедленного и модифицированного высвобождения, суспензиях Растворы для приема внутрь при различиях во вспомогательных веществах Липосомальные формы, эмульсии при отличии в составах, мицеллообразующие препараты с учетом критериев
Исследование фармакодинамической биоэквивалентности (приложение 2 Правил проведения исследований биоэквивалентности)	Невозможно выполнить количественную оценку в биосреде, либо она не является суррогатной точкой эффективности Измеряемая реакция отражает фармакологический или терапевтический эффект и может быть измерена количественно
Сравнительные клинические исследования эквивалентности (приложение 3 Правил проведения исследований биоэквивалентности)	Невозможно выполнить ни одно из вышеперечисленных исследований.

Начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации ЕАЭС отметил, что законодательство ЕАЭС также определяет, когда требуется проведение исследований биоэквивалентности:

- при внесении изменений в регистрационное досье зарегистрированного лекарственного препарата (при изменении состава вспомогательных веществ, технологии производства, места производства, укрупнении или разукрупнении промышленной серии и т.д.);
- на предрегистрационном этапе при существенном изменении состава, технологии производства лекарственного препарата (если основные доклинические и клинические исследования проведены с неизмененным лекарственным препаратом и необходимо экстраполировать полученные данные о безопасности и эффективности на измененный лекарственный препарат);
- при изменении лекарственной формы с немедленным высвобождением на лекарственную форму с модифицированным высвобождением;
- при разработке комбинированных лекарственных препаратов.



Данный доклад представителя ЕЭК вызвал интересную дискуссию среди участников мероприятия. Завершил секцию доклад руководителя отдела фармакологических исследований ООО «ОЛФАРМ» **Богдана Крапивина**, посвященный вопросам функционирования системы GLP (надлежащая лабораторная практика) в центрах по проведению доклинических исследований.

Следующая секция была посвящена прикладным вопросам исследований биоэквивалентности и теста «Растворение». Исполнительный директор X7 RESEARCH Co. Ltd. **Дмитрий Крючков** выступил с докладом «Особенности мониторинга исследований биоэквивалентности», в ходе которого напомнил необходимость соблюдать этапы исследования:

- **1-й этап – подготовительный** (разработка документации, выбор центра и аналитической лаборатории, обеспечение центра);
- **2-й этап – клинический** (подбор добровольцев, выполнение требований протокола, стандартизация условий проведения исследования, отбор и хранение проб);
- **3-й этап – биоаналитический** (валидация методик, определение активного вещества в биоматериале);
- **4-й этап – заключительный** (обработка полученных данных, их оценка, расчет статистики и подготовка заключительного отчета).

Говоря об особенностях мониторинга клинических исследований биоэквивалетности (рисунок 1), спикер отметил, что накануне и во время приема исследуемого препарата необходимо проверить ИЛП/ФИС, страховые полисы и т.д., соответствие крите-

риям включения/невключения, убедиться в госпитализации достаточного числа субъектов, проверить соблюдение процедуры госпитализации, контролировать выполнение процедур исследования по протоколу и проверить правильность присвоения рандомизационных кодов. После приема исследуемого препарата следует контролировать выполнение процедур исследования по протоколу, в том числе отбор ФК-проб, пробоподготовку, осмотры и обследования, соблюдение диеты, приема жидкости, физические нагрузки и режим. В случае любых отклонений при выполнении процедур протокола следует немедленно информировать персонал исследовательского центра об этом.



Рисунок 1. Мониторинг клинических исследований биоэквивалентности

Заместитель директора по операционной деятельности ООО «Статэндокс» **Александр Солодовников** представил особенности проведения исследования биоэквивалентности лекарственных средств в разных лекарственных формах и/или с модифицированным высвобождением. Кроме того, прозвучал доклад коммерческого директора ООО «Эрвека» **Ильи Петрова** *«Передовые решения компании ERWEKA для проведения теста растворения. Презентация нового тестера ERWEKA DFZ II «Проточная ячейка».* Следует отметить, что докладчиком были продемонстрированы демо-образцы аппаратов ERWEKA, в том числе новая «Проточная ячейка», которая в настоящее время необходима для исследования растворения суппозиториев на липофильной основе согласно Государственной фармакопее РФ XIII издания.



В третьей секции («Аналитические методики») конференции прозвучали доклады руководителя отдела физико-химических методов анализа ООО «ОЛФАРМ» к.х.н. **Маргариты Лебедевой** «Разделение энантиомеров веществ методом капиллярного электрофореза в анализе фармпрепаратов» и старшего научного сотрудника центра клинической фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, к.х.н. **Татьяны Родиной** «ВЭЖХ-МС в биоаналитических исследованиях: основные проблемы и ошибки». Первый докладчик акцентировал внимание участников конференции на преимуществах метода капиллярного электрофореза, обладающего широкими возможностями в разделении энантиомеров по сравнению с жидкостной хроматографией:

- экономичность, т.к. практически не требуется применение дорогостоящих высокочистых растворителей;
- малый расход реактивов;
- отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок;
- отсутствие дорогостоящих прецизионных насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- «относительная» простота аппаратурного оформления;
- экспрессность анализа.

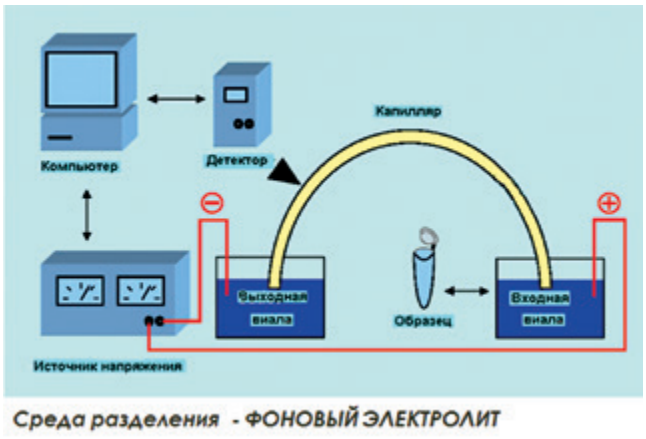


Рисунок 2. Принцип капиллярного электрофореза

Доклад **Татьяны Александровны**, как представителя регуляторного органа, вызвал существенный интерес слушателей.

Конференцию посетили более 120 человек из России (Москва, Московская область, Санкт-Петербург) и Белоруссии. Слушатели отметили высокий уровень организации и проведения семинара и традиционно высказали пожелание о проведении подобных мероприятий в будущем.

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 615.014.22

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ НАЛТРЕКСОНА ОСНОВАНИЯ, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ

С.А. Кедик[1,2], О.А. Омельченко[1], В.В. Суслов[1,2]*, Е.А. Шняк[1,2]

Резюме. Работа посвящена промышленно применимому способу получения полимерных микрочастиц с инкапсулированным налтрексона основанием, выполняемому в проточном режиме. Разработана установка на базе проточного диспергатора собственной конструкции. Подобраны параметры проведения процесса инкапсулирования для получения микрочастиц, обладающих характеристиками, сходными с характеристиками микрочастиц, входящих в состав препарата Вивитрол® и его отечественного аналога, разработанного ранее. Показана способность полученных микрочастиц обеспечивать пролонгированное высвобождение налтрексона основания в условиях эксперимента *in vitro* в течение 28 дней.

Ключевые слова: полимерные микрочастицы, препараты пролонгированного действия, проточное диспергирование, налтрексон, Вивитрол®.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE PREPARATION OF THE NALTREXONE BASE ENCAPSULATED IN POLYMERIC MICROPARTICLES

S.A. Kedik[1,2], O.A. Omelchenko[1], V.V. Suslov[1,2]*, E.A. Shnyak[1,2]

Abstract. The study is devoted to novel manufacturing method of preparation of polymeric microparticles, loaded by naltrexone base, in flow through regime. Special module construction was developed for providing emulsification in continuous regime. Focusing on production of polymeric microparticles with characteristics, compatible with characteristics of the pharmaceutical Vivitrol and its native analogue, parameters of encapsulation process were defined. An ability of prepared microparticles to prolonged drug release during 28 days was demonstrated.

Keywords: polymeric microparticles, long-acting products, flow-through dispersion, naltrexone, Vivitrol.

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

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

1 – Moscow Technical University (MITHT), 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – CJSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», b.1, 21/32, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широкое применение в медицине и фармацевтике находят полимерные микрочастицы, предназначенные для контролируемой доставки противовоспалительных соединений, местных анестетиков, антибиотиков, противораковых агентов и других видов лекарственных средств [1–5]. Также полимерные микрочастицы используют в качестве компонентов вакцин и адъювантов [4].

Ранее нашим коллективом на базе ЗАО «Институт фармацевтических технологий» был разработан аналог зарубежного препарата Вивитрол® (Alkermes, США) со сроком терапевтического действия 28 дней, основу которого составляют полимерные микрочастицы, содержащие инкапсулированное лекарственное средство (ЛС) – налтрексона основание [6]. Получение микрочастиц с заданными характеристиками является сложной задачей. Традиционным решением является применение реакторов периодического действия, что подразумевает трудно масштабируемый процесс, малопригодный для промышленного внедрения.

В данной работе представлены результаты исследований, посвященных разработке способа получения микрочастиц с использованием проточного диспергатора собственной конструкции [7]. Разработанный способ является легко масштабируемым и позволяет получать полимерные микрочастицы с инкапсулированным налтрексона основанием в количествах, достаточных для их промышленного производства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проведенных экспериментах использовались налтрексона основание (Cilag AG, Германия), сополимер молочной и гликолевой кислот

75:25 с ММ 81 кДа Resomer RG 755 S (Evonik Industries, Германия), хлористый метилен (х.ч., ГОСТ 9968-86), поливиниловый спирт BF-08 с ММ 40 кДа (Chang Chun Petrochemical Co. Ltd, Тайвань).

Для получения микрочастиц использовали установку (рисуники 1, 2), состоящую из проточного диспергатора с верхнеприводной мешалкой IKA (Германия), перистальтических насосов V 2015/YZ2515X (SHENCHEN Lab, КНР) и магнитной мешалки без подогрева «РИТМ-01» («Аквилон», Россия).

Полимерные частицы получали по следующей методике: водный раствор поливинилового спирта (ПВС) и раствор смеси сополимера молочной и гликолевой кислот / налтрексона основания в массовом соотношении 1:1 в хлористом метилене (ХМ) подавали с помощью насосов 4 и 5 в рабочую камеру проточного диспергатора 2, в которой происходило их смешение и механическое диспергирование лопастным диспергирующим элементом со скоростью 1000 об/мин. Образованную эмульсию типа «масло – вода» собирали в приемную емкость 9, выдерживали в течение 18 ч при температуре 25 °С и постоянном перемешивании посредством магнитной мешалки 10, в результате чего происходила экстракция/испарение хлористого метилена и формирование твердых полимерных частиц. Затем полученную суспензию микрочастиц концентрировали на центрифуге ЦВн-20Р (ООО «ПОЛИКОМ», Россия) при 4000 об/мин в течение 5–7 мин. Осажденные частицы лиофильно высушивали на лиофильной сушке «ИНЕЙ-6» («ИБП-РАН», Россия) при следующих параметрах: температура полки – +25,5 °С; температура конденсора – –50 °С; разряжение – 0,05 мБар.

Анализ среднего диаметра и распределения по размеру полученных полимерных микрочастиц проводили с помощью лазерного анализатора частиц LS 13320 (Beckman Coulter, США).

Количественное определение содержания налтрексона основания в полимерных микрочастицах проводили с помощью хроматографического метода с использованием жидкостного хроматографа «Стайер» (Россия) с колонкой Luna C18 (2) Phenomenex размером 4,6×250 мм, заполненной сорбентом с диаметром частиц 5 мкм, и УФ-детектированием (длина волны 230 нм). Для проведения анализа точную навеску микрочастиц растворяли в чистом ацетонитриле с использованием ультразвуковой ванны в течение 10 мин при комнатной температуре с образованием 0,1% масс./об. раствора. Далее первичный раствор смешивали с подвижной фазой с образованием 2 об.% раствора и оставляли при комнатной температуре на 5 мин [8].



Верхнеприводная мешалка IKA



Лазерный анализатор частиц LS 13320 Beckman Coulter

Изучение кинетики высвобождения налтрексона из микрочастиц проводили согласно методике, описанной в [8], при 37 °С в термостатирующей бане LOIP LB-224 (Россия) в фосфатном буфере (pH 7,35–7,45) с добавлением эмульгатора (0,018% полисорбат 20); концентрацию налтрексона определяли спектрофотометрически при длине волны 281 нм на спектрофотометре СФ-104 («Аквилон», Россия).

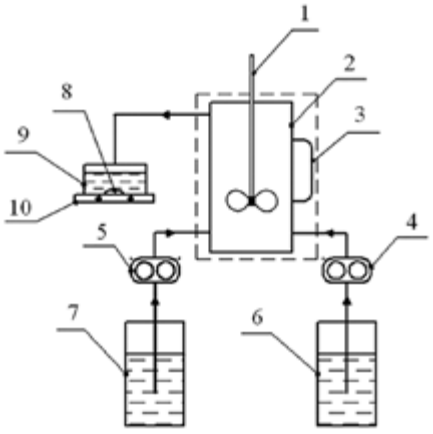


Рисунок 1. Принципиальная схема установки для получения полимерных микрочастиц в проточном режиме: 1 – лопастной диспергирующий элемент; 2 – рабочая камера диспергатора; 3 – циркуляционный канал диспергатора; 4, 5 – перистальтические насосы; 6, 7 – емкости с исходными реагентами; 8 – стержень магнитной мешалки; 9 – приемная емкость; 10 – магнитная мешалка

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в периодическом режиме полимерные микрочастицы, входящие в состав разработанного нами препарата с пролонгированным высвобождением налтрексона основания, имели следующие характеристики (таблица 1, рисунок 3).

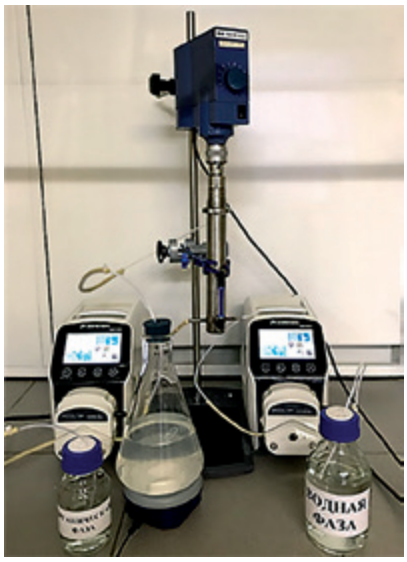


Рисунок 2. Установка для получения полимерных микрочастиц в проточном режиме

Таблица 1.

Характеристики полимерных микрочастиц, полученных в периодическом режиме [6]

Показатель	Полимерные микрочастицы с налтрексоном
Размер частиц, мкм	d_{10}: >21,1±0,4; d_{50}: 41±1,8; d_{90}: <57±1,5
Содержание налтрексона, мг/г	405±5
Высвобождение налтрексона основания в среду растворения, %	
1-й день	2,7±1
7-й день	25,6±1
14-й день	43,4±2
28-й день	69,7±3

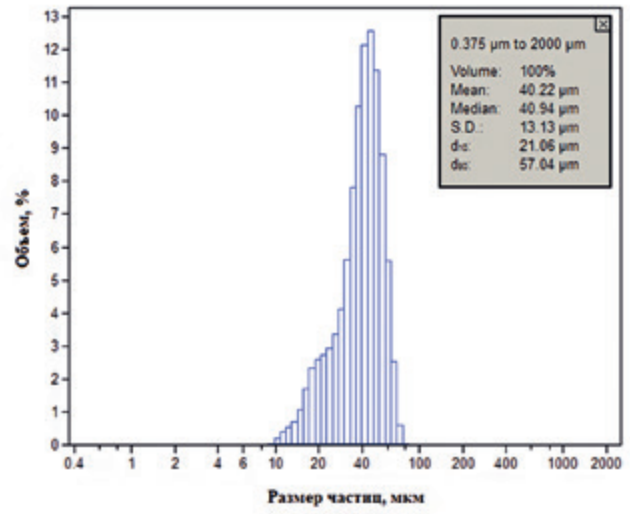


Рисунок 3. Распределение микрочастиц по размерам

В ходе разработки проточного способа получения микрочастиц мы изучили влияние скорости вращения диспергирующего элемента, концентрации поверхностно-активного вещества в водной фазе и расхода водной и органической фаз на характеристики микрочастиц.

Первоначально мы использовали условия, аналогичные условиям получения микрочастиц в периодическом режиме [6]:

- соотношение полимер/ЛС в органической фазе – 1:1;
- концентрация ПВС в водной фазе – 2%;
- скорость вращения диспергирующего элемента – 400 об/мин;
- соотношение объемов водной и органической фаз – 1/6.

Подачу органической фазы в рабочую камеру диспергатора осуществляли при минимально возможной производительности используемого насоса – 5 мл/мин. Подачу водной фазы осуществляли с расходом 30 мл/мин. Полученные при данных параметрах процесса полимерные частицы имели средний диаметр около 98,5 мкм и содержали около 395 мг/г налтрексона основания (таблица 2, эксперимент № 1).

При подборе условий, необходимых для образования частиц с профилем высвобождения ЛС, аналогичным профилю частиц, полученных в периодическом режиме, изучили влияние изменения скорости диспергирования и концентрации ПВС на размер получаемых микрочастиц (таблица 2, рисунок 4).

Таблица 2.

Влияние скорости вращения лопастного диспергирующего элемента и концентрации ПВС на размер полимерных микрочастиц

№ эксперимента	Конц. ПВС, % масс./об.	Скорость диспергирования, об/мин	Ср. диаметр частиц, мкм	Колич. содержание налтрексона, мг/г
1	2	400	98,5±3	395
2	2	800	59,6±2	408
3	2	1000	47,8±3	411
4	1	1000	коагулюм	–
5	3	1000	26,3±5	398

Увеличение скорости диспергирования до 800 и 1000 об/мин способствовало формированию частиц со средним размером около 59,6 и 47,8 мкм соответственно (эксперимент № 2 и 3). При использова-

нии 1% раствора ПВС и скорости диспергирования 1000 об/мин наблюдалось образование полимерного коагулюма (50% от массы загруженного полимера и налтрексона) в результате недостаточной стабилизации полученной дисперсии, тогда как при повышении концентрации ПВС до 3% сформировались частицы со средним диаметром 26,3 мкм.

Полимерные микрочастицы, полученные в проточном режиме в экспериментах № 1, 2 и 5, имели значительные расхождения по кинетике высвобождения ЛС. Частицы, полученные в эксперименте № 3, и частицы, полученные в периодическом режиме (таблица 1), имели сходный профиль высвобождения налтрексона в условиях эксперимента *in vitro* (рисунок 4).

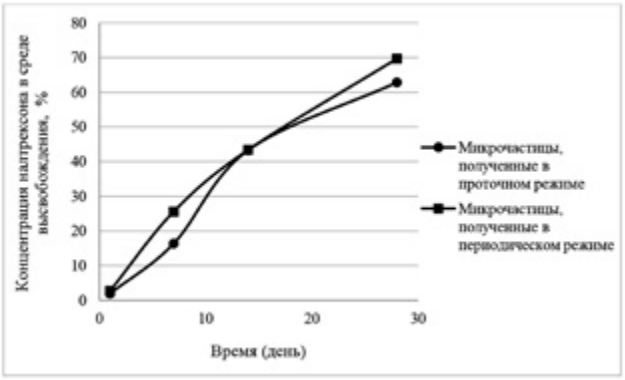


Рисунок 4. Кинетика высвобождения налтрексона из полимерных микрочастиц

С целью повышения производительности установки мы изучили влияние увеличения расходов и изменения соотношения водной и органической фаз на характеристики микрочастиц (таблица 3); остальные параметры процесса (соотношение полимер / лекарственное средство в органической фазе, концентрация ПВС в водной фазе, скорость диспергирования) были неизменными.

Таблица 3.

Влияние соотношения расходов водной и органической фаз на характеристики полимерных микрочастиц

№ эксперимента	Расход вод. фазы, мл/мин	Расход орг. фазы, мл/мин	Средний диаметр частиц, мкм	Колич. содержание налтрексона, мг/г
3	30	5	47,8±3	411
6	30	10	59,4±3	413
7	40	10	34,3±2	407
8	50	10	25,3±2	409

Увеличение расхода органической фазы до 10 мл/мин при сохранении расхода водной фазы привело к увеличению среднего диаметра частиц (эксперимент № 6), тогда как увеличение расхода водной фазы привело к его уменьшению (эксперименты № 7 и 8). Таким образом, условия проведения процесса, соответствующие эксперименту № 3, являются оптимальными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов разработан способ и подобраны оптимальные условия получения полимерных микрочастиц с инкапсулированным налтрексона основанием в проточном режиме.

Характеристики полученных микрочастиц, обеспечивающих пролонгированное действие налтрексона, соответствовали характеристикам микрочастиц, входящих в состав препарата Вивитрол® и его отечественного аналога, что делает перспективным промышленное внедрение разработанного способа получения микрочастиц в проточном режиме.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, R. Vanbever. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs // Advanced drug delivery reviews. 2014. V. 75. P. 81–91.
2. S. Rahimian, M.F. Fransen, J.W. Kleinovink, M. Amidi, F. Ossendorp, W.E. Hennink. Polymeric microparticles for sustained and local delivery of antiCD40 and antiCTLA-4 in immunotherapy of cancer // Biomaterials. 2015. V. 61. P. 33–40.
3. Y. Zhang, H.F. Chan, K.W. Leong. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future // Advanced drug delivery reviews. 2013. V. 65. № 1. P. 104–120.
4. Е.С. Кедик, А.В. Панов, Е.А. Петрова, В.В. Суслов. Полимерные микрочастицы для медицины и биологии. – М.: ИФТ, 2014. 480 с.
5. Drug delivery: principles and applications / Ed. by B. Wang, L. Hu, T.J. Siahaan. – New Jersey: J. Wiley & Sons, 2016. 713 p.
6. Е.А. Петрова, С.А. Кедик, К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, А.В. Панов, В.В. Суслов, Н.В. Тихонова. Изучение параметров микроинкапсулирования при получении пролонгированной формы налтрексона // Химико-фармацевтический журнал. 2014. № 1(48). С. 50–53.
7. С.А. Кедик, О.А. Омельченко, В.В. Суслов, Е.А. Шняк. Разработка проточного микромодуля для получения полимерных микро- и наночастиц нагруженных лекарственными веществами // Материалы VI всероссийской молодежной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии – 2015». 2015. С. 56–57.
8. Е.А. Петрова. Разработка состава и технологии получения инъекционной лекарственной формы налтрексона с модифицированным высвобождением: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М. 2014. 147 с.

УДК 615.014

РАЗРАБОТКА МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, СОДЕРЖАЩИХ ТВЕРДЫЕ ДИСПЕРСИИ

В.В. Грих[1]*, И.И. Краснюк (мл.)[1], О.И. Степанова[1], А.В. Беляцкая[1], И.И. Краснюк[1], В.В. Тарасов[1], Д.А. Козин[1], Е. Нестеренко[2]

Резюме. Разработана технология получения образцов мазей нифедипина на эмульсионной и гидрофильной основах с применением метода твердых дисперсий. Проведена оценка качества полученных мягких лекарственных форм. Доказана эффективность предложенной технологии получения мазей нифедипина, позволяющей повысить фармацевтическую доступность малорастворимого в воде исследуемого вещества, обеспечивая лучшее высвобождение за счет повышения его растворимости и скорости растворения.

Ключевые слова: нифедипин, твердые дисперсии, мазь, биодоступность.

DEVELOPMENT OF PRODUCING SOFT MEDICINAL FORMS CONTAINING SOLID DISPERSION

V.V. Grih[1]*, I.I. Krasnyuk (jr.)[1], O.I. Stepanova[1], A.V. Belyatskaya[1], I.I. Krasnyuk[1], V.V. Tarasov[1], D.A.Kozin[1], E. Nesterenko[2]

Abstract. The technology of obtaining samples of ointments of nifedipine on the emulsion and hydrophilic bases using the method of solid dispersions is developed. The quality of the obtained soft medicinal forms was evaluated. The effectiveness of the proposed technology for the preparation of nifedipine ointments has been proved, which makes it possible to increase the pharmaceutical availability of the water-soluble test substance, providing better release by increasing its solubility and dissolution rate.

Keywords: nifedipine, solid dispersions, ointment, bioavailability.

1 – ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

2 – Национальный центр исследований чувствительных элементов, Ирландия, Дублин 9, Гласневин, Университетский городок Дублина

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

2 – National Centre for Sensor Research, Dublin City University, Glasnevin, Dublin 9, Ireland

*** адресат для переписки:**
E-mail: lee.toriya@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Для создания лекарственных препаратов (ЛП) с оптимизированными биофармацевтическими характеристиками перспективным является метод получения твердых дисперсий (ТД). ТД – би- или многокомпонентные нано- или коллоидно-дисперсные системы, состоящие из действующего вещества (ДВ) и носителя, представляющие собой твердые растворы с образованием структурных комплексов переменного состава. Использование ТД актуально для повышения высвобождения ДВ из лекарственной формы (ЛФ), улучшения фармакологической активности и биодоступности за счет увеличения его растворимости и скорости высвобождения [1].

Мази широко используются в дерматологии, проктологии, сосудистой терапии благодаря возможности введения в состав взаимореагирующих веществ, относительной простоте и безопасности применения по сравнению с другими ЛФ (инъекционными, пероральными), а также удобству транспортировки и хранению.

Нифедипин является синтетическим производным 1,4-дигидропиридина. По своим физическим свойствам нифедипин – желтый кристаллический порошок, легко растворим в ацетоне, умеренно растворим в спирте 96%, практически нерастворим в воде. Температура плавления – 171–175 °С [2, 3]. Являясь блокатором кальциевых каналов, нифедипин непосредственно оказывает сосудорасширяющее, гипотензивное, антиангинальное действие. Известно, что патогенез анальной трещины обусловлен спазмированием внутреннего анального сфинктера. Нифедипин предотвращает транспорт ионов кальция внутрь клеток и тем самым уменьшает тонус анального сфинктера [4, 5]. Существенный фактор, ограничивающий применение нифедипина – его крайне низкая растворимость в воде. Разработка технологии и состава мягких ЛФ, содержащих ТД нифедипина с усовершенствованными биофармацевтическими свойствами, является актуальной проблемой современной фармации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования в работе использовали нифедипин [субстанция-порошок, содержание нифедипина 99%, серия PNFD150052, «Юник Кемикалс», Индия (годен до 11/2020)]. В качестве носителей ТД использовали ПЭГ с молекулярными массами 400 и 1500 (Merck, Германия) и ПВП с молекулярной массой 10000 (Sigma-Aldrich, США).

Одним из нежелательных факторов, влияющих на технологию, является малая растворимость нифедипина в воде. В связи с этим нифедипин в состав мазей вводили в виде ТД с полимерами. Наиболее перспективным в отношении ТД является введение в гидрофильные основы. Особенность разработанной технологии мазей заключается в отсутствии отдельного технологического этапа получения самой ТД, требующего стандартизации и оценки качества промежуточного продукта. В предложенной технологической схеме ТД получаются непосредственно в момент введения компонентов в основу. При изготовлении мазей-растворов на гидрофильной основе (основа для изготовления ректальных мазей) компоненты ТД вводили в расплавленную мазь при 40±2 °С – смесь ПЭГ-1500 : ПЭГ-400 (1,0:2,3 по массе). Полученные мази тщательно перемешивали, фасовали в герметичные упаковки.

Таким образом, изготовлены мази, составы которых представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Составы разработанных мазей (на 100 г)

Ингредиент		состав № 1	состав № 2
нифедипин		0,200	0,200
ПВП		–	0,200
гидрофильная основа	ПЭГ-1500	29,940	29,740
	ПЭГ-400	69,860	69,860

Оценка качества полученных мазей проводилась по следующим показаниям: описание, подлинность, количественное определение содержания ДВ, значение pH, высвобождение. Подлинность нифедипина устанавливали с помощью УФ-спектров и качественных реакций. Растворы отфильтрованной водной вытяжки, полученной из мягких ЛФ, имеют типичный для нифедипина максимум поглощения при 340±2 нм.

Качественная реакция на нифедипин основана на ЛФ, оранжево-красном окрашивании при взаимодействии с раствором натрия гидроксида. Для этого исследуемый образец – навеску (2,0 г) разработанных мягких ЛФ – взбалтывают в 50 мл воды, фильтруют через бумажный фильтр. Из полученного раствора отбирают 10 мл и смешивают с 5 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Наблюдение оранжево-красного окрашивания доказывает наличие нифедипина в исследуемом образце.

Для изучения скорости и полноты высвобождения ДВ из разработанных мягких ЛФ использовали метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. Навеску модельной смеси (2,0 г) наносили равномерным слоем на мембрану (нелакированный целлофан толщиной 40 мкм), неподвижно закрепленную обхваткой на конце полой диализной трубки. Площадь диализной поверхности – 5,90±0,19 см^2. Трубку с навеской опускали на 2–3 мм в диализную среду (вода очищенная). Объем диализной среды – 30 мл. Температура инкубации – 32±0,5 °С (температура кожного покрова). Через 1, 2, 3, 4, 5, 6 ч осуществляли забор проб диализата в объеме 1 мл. Отобранные порции диализата восполняли водой очищенной до первоначального объема – 30 мл. Количественное содержание ДВ в диализате определяли спектрофотометрически. Получали необходимые разведения пробы и измеряли оптическую плотность раствора при соответствующей для данного ДВ длине волны – 340±2 нм. Опыт проводили в 3-кратном повторении на трех навесках модельной смеси одного образца. В качестве мази сравнения использовали мазь нифедипина на гидрофобной основе, используемую в экстемпоральном производстве, изготовленную по стандартной для малорастворимых лекарственных веществ технологии – растиранием рассчитанного количества нифедипина с вазелином. Готовят данную мазь по следующей технологии: 0,2 г нифедипина смешивают в ступке с вазелином в количестве 99,8 г до получения однородной смеси. Данная мазь является суспензионной.

Для изучения стабильности при хранении и сроков годности полученные образцы мазей были заложены на хранение. Исследование осуществляли в соответствии со статьей ГФ XIII «Сроки годности лекарственных средств». Образцы ЛФ хранили в алюминиевых тубах с навинчивающимся колпачком из полипропилена. Исследуемые образцы были разделены на две группы. Одну группу хранили в сухом, защищенном от света месте при температуре не более 15–25 °С, а другую – в термостате при 40±1 °С. В день изготовления и при хранении (через каждые 6 мес хранения в естественных условиях и через каждые 48 суток – срок, эквивалентный 6 мес при хранении способом «ускоренного старения») образцы ЛФ анализировали по следующим показателям: описание, подлинность, количественное содержание ДВ, pH.

Таблица 2.

Показатели качества разработанных мягких лекарственных форм

Показатели	Методы	Результаты
Описание, органолептические свойства	Визуальный	Мази – однородные, светло-желтые вязкие массы, без запаха
Подлинность	УФ-спектрофотометрия, качественные реакции	УФ-спектры водных вытяжек мази от 190 до 500 нм должны соответствовать по характеристическим пикам стандарту нифедипина. Получение оранжево-красного окрашивания при взаимодействии с раствором натрия гидроксида
Количественное определение	УФ-спектрофотометрия	100,000±3,000%
pH водного извлечения	ГФ XIII	5,5±0,5
Упаковка	В алюминиевых тубах с навинчивающимся колпачком из полипропилена, 20 г. 1 туба вместе с аппликатором в картонной пачке	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	
Срок годности	1 год	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенной оценки качества полученных мазей отражены в таблице 2.

В результате проведенных исследований установлено, что введение нифедипина в виде ТД в мази повышает его высвобождение из мягких ЛФ.

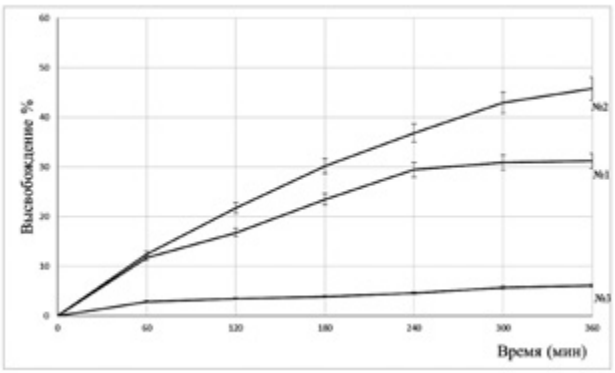


Рисунок 1. Высвобождение нифедипина из разработанных мазей.

№ 1 и № 2 – образцы мазей с ТД нифедипин на гидрофильной основе, № 3 – мазь нифедипина на гидрофобной основе

По результатам анализа выявлено, что мази, изготовленные на гидрофильной основе с применением метода ТД, имеют наибольшую степень высвобождения по сравнению с мазью сравнения. Так, в сравнении с гидрофобной основой, содержащей ДВ, высвобождение ДВ из образца № 1 увеличилось в 5,3 раза, из образца № 2 – в 7,5 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенная схема технологии получения мазей с ТД малорастворимого в воде нифедипина позволяет повысить его фармацевтическую доступность, обеспечивая лучшее высвобождение за счет повышения растворимости и скорости растворения нифедипин. Следствием этого является снижение дозы и побочного действия на организм.

ЛИТЕРАТУРА

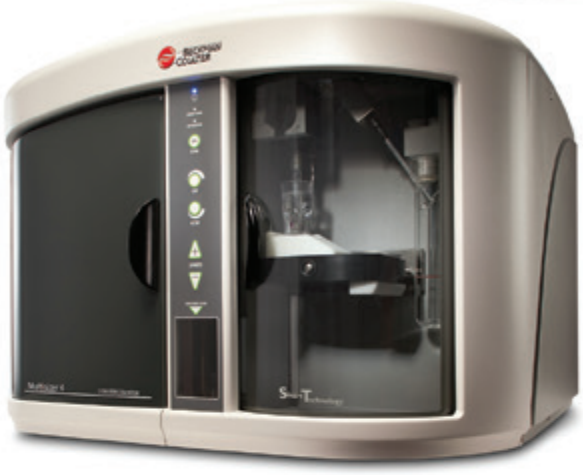
1. И.И. Краснюк (мл.). Разработка и совершенствование технологии мягких лекарственных форм с применением твердых дисперсий и 100 физических смесей с ПЭГ: дис. ... к.фарм.н. – М. 2003. 199 с.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. – М. 2015.
3. Y. Fujimoto, N. Hirai, T. Takatani-Nakase, K. Takahashi. Preparation and Evaluation of Solid Dispersion Tablets by a Simple and Manufacturable Wet Granulation Method Using Porous Calcium Silicate // ChemPharmBull. 2016. V. 64(4). P. 15–19.
4. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2014. 1216 с.
5. В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия, М.Ю. Маркелов, Е.Г. Конарева. Определение нифедипина в биологическом материале // Судебно-медицинская экспертиза. 2011. № 4. С. 31–34.

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)

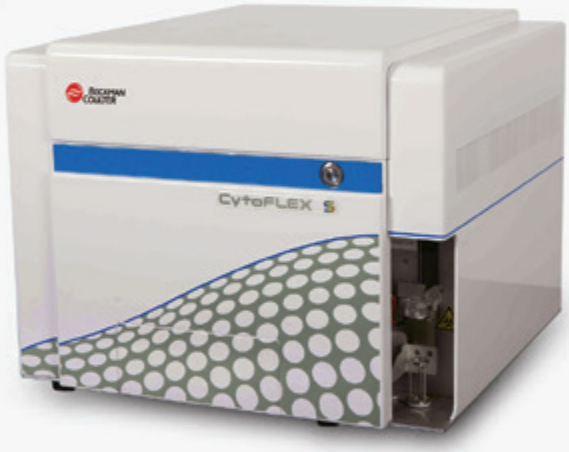


Анализатор размеров частиц методом лазерной дифракции

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!

УДК 615.453.1

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДРАЖЕ С ИЗОНИАЗИДОМ И ОФЛОКСАЦИНОМ

Ю.В. Шикова[1], О.Е. Зайцева[1]*, А.Р. Кадыров[1], Е.В. Симонян[2], Т.А. Лиходед[1]

Резюме. Разработан состав и технологическая схема получения комбинированных драже, содержащих изониазид и офлоксацин. Изучены показатели качества разработанных драже. Установлен срок годности драже с изониазидом и офлоксацином – 2 года при хранении в банках из стекломассы с винтовой горловиной, закрытых пластмассовыми крышками, в сухом, защищенном от света месте при температуре 20–25 °С.

Ключевые слова: драже, изониазид, офлоксацин.

DEVELOPMENT OF THE COMPOSITION AND TECHNOLOGY FOR THE PREPARATION OF THE DRAGEE WITH IZONIAZIDE AND OILOXACIN

Yu.V. Shikova[1], O.E. Zaytseva[1]*, A.R. Kadyrov[1], E.V. Simonyan[2], T.A. Lihoded[1]

Abstract. A composition and a technological scheme for the preparation of the combined dragees, containing isoniazid and ofloxacin, were developed. The parameters of the quality of the developed dragees, were studied. The shelf life of the dragee with isoniazid and ofloxacin has been established, when stored 2 years, in glass-massed banks with a screw mouth closed with plastic caps in a dry, dark place at a temperature of 20–25 °C.

Keywords: dragee, isoniazid, ofloxacin.

1 – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

2 – ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64

1 – Bashkir State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Lenina str., Ufa, 450008, Russia

2 – South-Urals State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 64, Vorovsky str., 454092, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез продолжает оставаться ведущей инфекционной причиной смерти в мире [1]. Несмотря на прогресс, достигнутый в повышении темпов лечения туберкулеза, большую озабоченность у медицинской общественности вызывает лекарственная устойчивость возбудителя туберкулеза – бациллы *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Считается, что рост случаев множественного лекарственно-устойчивого туберкулеза (МЛУ-ТБ) в основном обусловлен низким комплаенсом пациентов к длительной комбинированной противотуберкулезной терапии [1]. Для решения этой проблемы проводится переоценка существующих противотуберкулезных схем, в том числе и комбинаций с фторхинолоном, для оптимизации их эффективности, профиля безопасности, продолжительности и стоимости [3–8].

Разработка новых лекарственных препаратов, улучшенных схем лечения в течение следующего десятилетия признана важнейшей стратегией ВОЗ по борьбе с туберкулезом, принятой Всемирной ассамблеей здравоохранения в 2015 г., предусматривающей резкое сокращение случаев туберкулеза и смертности от него [6]. ВОЗ и Международный союз борьбы с туберкулезом и болезнями легких (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, IUATLD) рекомендуют использование комбинаций с фиксированной дозой противотуберкулезных лекарственных средств в единой лекарственной форме (Fixed dose drug combinations (FDCs), что упрощает назначение лекарственных средств и может ограничивать риск МЛУ-ТБ, возникающего в результате неправильного выбора препарата и монотерапии [9–13].

Поскольку новые противотуберкулезные препараты бедаквилин и деламанид (деламанид не зарегистрирован в РФ, минимальная стоимость на курс лечения – 1700 долларов США) очень дороги, существующие проблемы приверженности пациентов к лечению туберкулеза могут быть решены при рациональном использова-

нии доступных противотуберкулезных лекарственных средств в новых комбинациях с фиксированной дозой, что является весьма актуальным [14–16]. Проведенный товароведческий анализ зарегистрированных в РФ противотуберкулезных средств позволил обосновать состав нового комбинированного противотуберкулезного препарата в лекарственной форме драже, содержащего изониазид и офлоксацин [17]. Оба лекарственных средства обладают доказанным бактерицидным эффектом в отношении *M. tuberculosis* и действуют на вне- и внутриклеточно расположенных возбудителей. Кроме того, для изониазида характерны низкая активность в отношении атипичных микобактерий и к нему при монотерапии быстро развивается резистентность возбудителя (в 70% случаев) [18]. Офлоксацин является противомикробным средством широкого спектра действия из группы фторхинолонов, активен в отношении большого числа микроорганизмов, в том числе и быстрорастущих атипичных штаммов *M. tuberculosis* [19]. Офлоксацин имеет идентичную биодоступность при пероральном приеме и парентеральном введении, практически не метаболизируется в печени, резистентность микроорганизмов к нему развивается редко, и его можно назначать одновременно со многими антибактериальными препаратами, в том числе и противотуберкулезными.

Использование комбинации изониазида и офлоксацина с фиксированными дозами в виде драже имеет потенциал в повышении комплаенса пациентов, так как эта лекарственная форма отличается удобством применения и сокрытием неприятного вкуса действующих веществ, что может способствовать соблюдению пациентами медикаментозного режима и тем самым повысить эффективность лечения туберкулеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработан состав и технологическая схема получения нового комбинированного противотуберкулезного лекарственного препарата в виде драже с наличием действующих веществ: изониазида (ФС 42-0236-07) и офлоксацина (П-8-242 № 009143 17.02.97). В одном драже массой 0,85–0,9 г содержалось 0,3 г изониазида и 0,4 г офлоксацина.

Из вспомогательных веществ для покрытия ядра драже использовалась смесь молочного сахара (ГОСТ Р 54664-2011 «Сахар молочный»), крахмала картофельного 1500 (ГОСТ 7699-78 «Крахмал картофельный») и кросповидона Polyplasdone (25249-54-1, Shanghai, China) в соотношении 2:1:1. Применялся 7% водный раствор картофельного крахмала в качестве увлажнителя 1; 3% водный раствор повидона (Plasdone C) в качестве увлажнителя 2; спиртовый раствор (этиловый спирт 95%), содержащий 5 мас. % ацетилфталилцеллюлозы (АФЦ) и 2 мас. % твина-80, в качестве ацидоустойчивого покрытия – увлажнителя 3; смесь 64% раствора сахарного сиропа и 1,5% водного раствора коллидона 25 в соотношении 5:1 в качестве увлажнителя 4.

Кросповидон Polyplasdone использовался в качестве дезинтегранта для наилучшего наслаивания действующих веществ и для обеспечения распадаемости. 3% водный раствор повидона (Plasdone C) выполнял функцию связующего агента благодаря своей способности к склеиванию и хорошим поверхностно-активным свойствам.

Коллидон-25 (НД 42-8482-98) (BASF, Германия) применялся в качестве пленкообразующего вещества для покрытия драже. Для получения драже использовались: сахар (ГОСТ 21-94), АФЦ (ФС 42-1263-79) (Acros), ацетон (ГОСТ 2603), спирт этиловый 95% (ФС.2.1.0036.15).

Все компоненты, входящие в состав комплексного драже, разрешены для медицинского применения.

Оценку качества драже с изониазидом и офлоксацином проводили по следующим показателям: внешний вид, подлинность и количественное содержание действующих веществ в драже, средняя масса, диаметр, целостность и прочность, время их распадаемости в искусственных пищеварительных соках, а также скорость высвобождения изониазида и офлоксацина из лекарственной формы.

Подлинность изониазида: драже растворяли в 5 мл воды очищенной, прибавляли 5 капель раствора сульфата меди. Раствор окрашивался в голубой цвет, и появлялся осадок, который при последующем нагревании растворялся, голубая окраска раствора при дальнейшем нагревании переходила в изумрудно-зеленую, а затем в грязно-желтую. При этом выделялись пузырьки газа.

Количественное определение изониазида: около 1 г порошка растертой лекарственной формы помещали в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 200 мл, растворяли в 100 мл воды очищенной, прибавляли 2 г гидрокарбоната натрия, 50 мл 0,1 н. раствора йода и оставляли на 30 мин в темном месте. После этого ставили на 10 мин в баню со льдом, затем небольшими порциями добавляли 20 мл кислоты хлороводородной (1:2). Избыток йода оттитровывали 0,1 М раствором тиосульфата натрия (индикатор – крахмал).

Подлинность офлоксацина определяли при помощи хлорида железа (III): с ним офлоксацин давал красное окрашивание.

Количественное определение офлоксацина: около 1 г (точная навеска) порошка растертой лекарственной формы помещали в сухую колбу, растворяли в 10 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивали 3–5 мин и фильтровали через сухой беззольный фильтр. Осадок в колбе и на фильтре промывали ледяной уксусной кислотой 2 раза по 5 мл. Фильтрат собирали в сухую колбу для титрования, прибавляли 2 капли кристаллического фиолетового и титровали 0,1 М раствором кислоты хлорной от фиолетового до зеленого окрашивания.

Применялись следующие приборы для определения механической прочности: тестеры для проведения испытания на истираемость PTF 10E; портативный тестер определения твердости PTB-M – для изучения прочности на раздавливание. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIII изд. (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») были проведены исследования по изучению кинетики высвобождения действующих веществ [20]. Определение проводили с использованием прибора «Вращающая корзинка». Среда растворения – буферный раствор с pH 6,8, объем среды растворения – 900 мл, перемешивание со скоростью 100 об/мин, время отбора проб – через каждые 15 мин. Количественное содержание высвободившихся из драже действующих веществ – изониазида и офлоксацина – в среду определяли методом УФ-спектрофотометрии (при длине волны для изониазида 234±1 нм, для офлоксацина – 214±1 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм на приборе HEWLETT PACKARD 8452A. Расчет вели по сравнению со стандартным образцом.

Растворение разработанных драже с изониазидом и офлоксацином определялось на ручном тестере растворения PT-DT70. Распадаемость проводили на электронном тестере контроля таблеток ERWEKA ZT 221 (Германия).



Тестер распадаемости ERWEKA ZT 221

Драже с изониазидом и офлоксацином получали в лабораторных условиях в дражировочном котле емкостью 350 см^3 с использованием стандартной сахарной крупки диаметром 2 мм. Диаметр драже определяли с помощью штангенциркуля (цифровой штангенциркуль «МЕГЕОН-80700») с точностью до 0,5 мм.

Технология получения комбинированного лекарственного препарата с изониазидом и офлоксацином в виде драже включала 11 стадий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментальных исследований было установлено, что оптимальным наполнителем в драже является смесь вспомогательных веществ: молочного сахара, крахмала картофельного 1500 и кросповидона Polyplasdone в соотношении 2:1:1, а также увлажняющих растворов: 7% водного раствора картофельного крахмала, 3% водного раствора повидона (Plasdone C), спиртового раствора (этиловый спирт 95%), содержащего 5 мас. % АФЦ и 2 мас. % твина-80. Вспомогательное вещество коллидон-25 препятствовало растрескиванию сахарного покрытия в драже с потерей влаги при высушивании, а смесь его 1,5% водного раствора с 64% раствором сахарного сиропа 64% в соотношении 5:1 благодаря повышенной адгезии к поверхностям обеспечивала надежную фиксацию слоев действующих веществ и вспомогательных веществ в завершающее глянцевое покрытие. Лекарственная форма драже предполагала удобство применения, стойкость при хранении.

1 стадия получения драже – наращивание слоя крахмала картофельного с раствором увлажнителя 1: смеси вспомогательных веществ – молочного сахара, крахмала картофельного 1500 и кросповидона Polyplasdone в соотношении 2:1:1, а также 7% водного раствора картофельного крахмала – на сахарную крупку (ядра) до диаметра драже 3 мм. Загрузка – 25 ядер, скорость вращения – 72 об/мин, угол наклона – 90°, принудительная подача теплого воздуха для подсушивания. Затем ядра равномерно увлажняли заранее приготовленным раствором связывающего вещества – увлажнителя 1.

2 стадия. Нанесение первого слоя офлоксацина (0,2 г) и увлажнение 2–3 раза увлажнителем 1, диаметр драже – 4 мм, сушка драже.

3 стадия. Накатка слоя 3% водного раствора повидона (Plasdone C), после чего драже подсушивали, диаметр драже – 6 мм.

4 стадия. Нанесение первого слоя изониазида (0,15 г), предварительно измельченного и просеянного через сито № 61, с увлажнителем 1 и с периодическим подсушиванием теплым воздухом, диаметр драже – 7 мм.

5 стадия. Наносили 3% водный раствор повидона (Plasdone C) – 2–3 слоя (увлажнитель 2).

6 стадия. Нанесение второго слоя офлоксацина (0,2 г) с увлажнителем 1 – 2–3 раза, после чего драже подсушивали в сушильном шкафу при температуре 45 °С.

7 стадия. Покрывали слоем увлажнителя 2 и далее наносили второй слой изониазида (0,15 г) с увлажнителем 1 и при периодическом подсушивании теплым воздухом, диаметр драже – 7,5 мм.

Подсушенные драже отсеивали от пыли и взвешивали, загружали в дражировочный котел для продолжения технологического процесса. На увлажненные драже в несколько приемов наносили порошок изониазида при периодическом подсушивании теплым воздухом.

8 стадия. Нанесение слоя наполнителя – молочного сахара, крахмала картофельного 1500 и кросповидона Polyplasdone в соотношении 2:1:1 – до диаметра драже 9 мм, драже периодически подсушивали теплым воздухом.

9 стадия. В 100 г 95% спирта этилового растворяли 5,0 г АФЦ и 2,0 г твина-80. Нанесение слоев спиртового раствора, содержащего АФЦ 5% и 2% твина-80, – 2–3 слоя (увлажнитель 3), драже подсушивали.

10 стадия. Нанесение слоя сахарного покрытия с 1,5% раствором коллидона-25 (увлажнитель 4) – 2–3 слоя, драже подсушивали, диаметр драже – 9–9,5 мм.

11 стадия. Готовую продукцию упаковывали в банки из стекла НС-1 с натягиваемой укупорочной крышкой. Далее банки упаковывали в групповую или транспортную тару в соответствии с ГОСТ 17768-90, ОСТ 64-071-89 и РД 00001910-6-92.

Полученные драже имели правильную шарообразную форму диаметром 9–9,5 мм с гладкой и ровной поверхностью однородного белого цвета или со слегка желтоватым оттенком. Показатели качества разработанного комплексного драже с изониазидом и офлоксацином в процессе хранения представлены в таблице 1.

В многослойной лекарственной форме разработанного драже слои действующих лекарственных средств чередовались со слоями экспериментально подобранных вспомогательных веществ. Последние благодаря ацидоустойчивости препятствовали высвобождению изониазида и офлоксацина в желудке. В модели кишечной среды драже с изониазидом и офлоксацином растворялось постепенно в течение одного часа и пролонгированно высвобождало эти лекарственные средства (рисунок 1). Более ускоренное высвобождение изониазида из лекарственной формы по сравнению с офлоксацином определялось его гидрофильными свойствами. Высокий уровень (95%) к 60 мин высвобождения офлоксацина из драже был достигнут благодаря использованию вспомогательного вещества повидон.

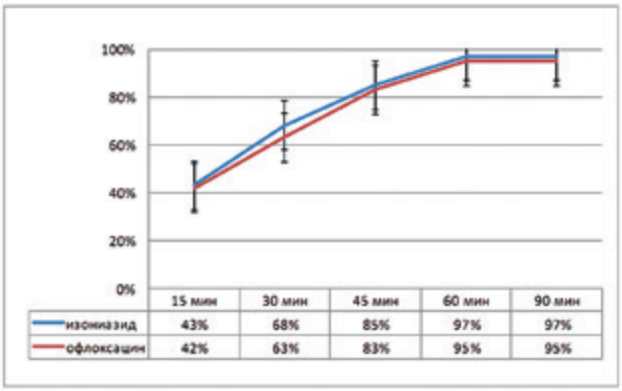


Рисунок 1. Кинетика высвобождения изониазида и офлоксацина из драже

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результатом экспериментальной работы явились разработка состава и получение нового комбинированного лекарственного препарата оте-

Таблица 1.

Стабильность драже с изониазидом и офлоксацином в процессе хранения в банках из стекла НС-1 с натягиваемой укупорочной крышкой при температуре 20–25 °С

Показатели качества	0 мес.	Через 6 мес.	Через 12 мес.	Через 24 мес.	Через 27 мес.
Внешний вид	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Подлинность	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует
∅ ср., мм	9,34±0,05	9,33±0,05	9,33±0,05	9,33±0,05	9,33±0,05
Средняя масса, г	1,11±0,02	1,10±0,05	1,10±0,05	1,10±0,04	1,10±0,02
Прочность на истирание, %	99,30±0,15	99,30±0,1	99,30±0,1	99,50±0,1	98,835±0,15
Прочность на рздавливание, кг/см^2 по ГФ в ньютонах	4±1	4±1	4 ±1	4±1	3,8±1
Распадаемость, мин	120±2	120±5	119 ±1	118±1	118±2
Содержание изониазида, г	0,30±0,02	0,30±0,12	0,30±0,10	0,30±0,15	0,29±0,05
Содержание офлоксацина, г	0,40±0,10	0,40±0,15	0,40±0,12	0,39±0,10	0,39±0,05

чественного производства в форме драже, содержащего изониазид и офлоксацин [21]. Изучено влияние вспомогательных веществ на показатели качества драже, а именно: целостность, прочность, высвобождение, распадаемость, установлен срок годности разработанных драже – 2 года при хранении в банках из стекломассы с винтовой горловиной, закрытых пластмассовыми крышками, в сухом, защищенном от света месте при температуре 20–25 °С.

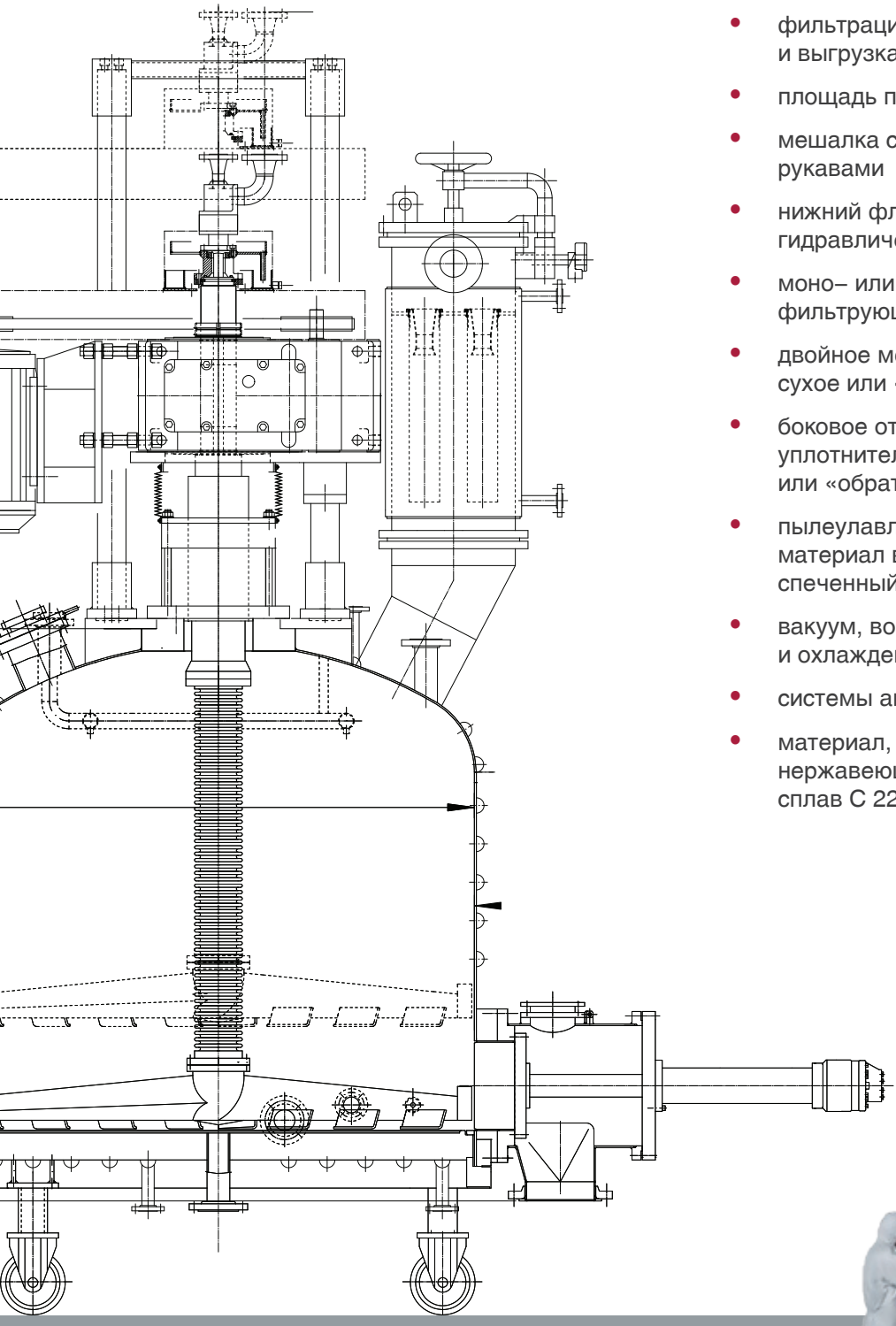
Разработанный комбинированный противотуберкулезный препарат в форме драже с недорогими, доступными активными фармацевтическими субстанциями – изониазидом и офлоксацином, обладающими доказанной бактерицидной активностью в отношении *M. tuberculosis*, перспективен для схем лечения туберкулеза, так как обеспечивает удобство применения, продолжительный срок хранения и ценовую приемлемость.

ЛИТЕРАТУРА

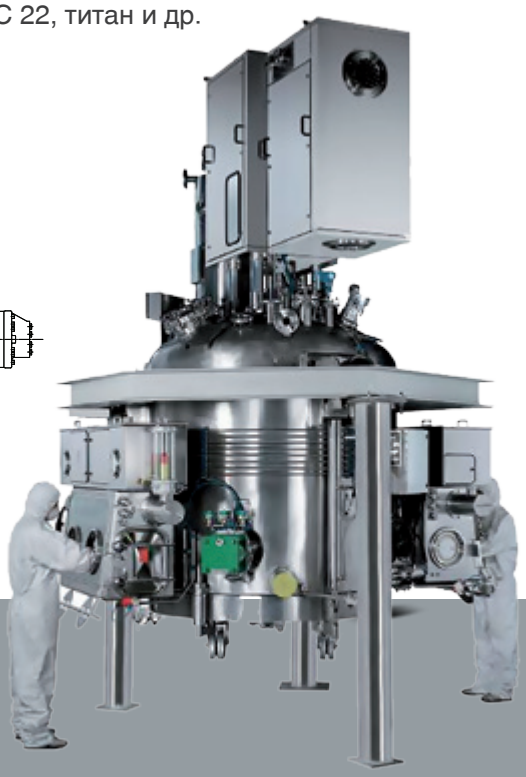
1. Global tuberculosis report 2016 / World Health Organization. URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary_ru.pdf?ua=1 (дата обращения 26.08.2017).
2. C.M. Denkinger, M. Pai, D.W. Dowdy. Do we need to detect isoniazid resistance in addition to rifampicin resistance in diagnostic tests for tuberculosis? // PLoS One. 2014. V. 9(1).
3. G. Ramachandran, S. Swaminathan. Safety and tolerability profile of second-line anti-tuberculosis medications // Drug Saf. 2015. V. 38(3). P. 253–269.
4. H.W. Lee, J.K. Lee, E. Kim, J.J. Yim, C.H. Lee. The effectiveness and safety of fluoroquinolone-containing regimen as a first-line treatment for drug-sensitive pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // PLoS One. 2016. V. 11(7).
5. L.E. Ziganshina, A.F. Titarenko, G.R. Davies. Fluoroquinolones for treating tuberculosis (presumed drug-sensitive) // Cochrane Database Syst Rev. 2013. V. (6).
6. E.A. Kendall, S. Shrestha, T. Cohen, E. Nuermberger, K.E. Dooley, L. Gonzalez-Angulo, G.J. Churchyard, P. Nahid, M.L. Rich, C. Bansbach, T. Forissier, C. Lienhardt, D.W. Dowdy. Priority-setting for novel drug regimens to treat tuberculosis: an epidemiologic model // PLoS Med. 2017. V. 14(1).
7. J.A. Caminero, G. Sotgiu, A. Zumla, G.B. Migliori. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis // Lancet Infect Dis. 2010. V. 10(9). P. 621–629.
8. S. Thee, A.J. Garcia-Prats, P.R. Donald, A.C. Hesseling, H.S. Schaaf. Fluoroquinolones for the treatment of tuberculosis in children // Tuberculosis (Edinb). 2015. V. 95(3). P. 229–245.
9. B. Blomberg, S. Spinaci, B. Fourie, R. Laing. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis // Bull World Health Organ. 2001. V. 79(1). P. 61–68.
10. R. Panchagnula, S. Agrawal, Y. Ashokraj, M. Varma, K. Sateesh, V. Bhardwaj, S. Bedi, I. Gulati, J. Parmar, C.L. Kaul, B. Blomberg, B. Fourie, G. Roscigno, R. Wire, R. Laing, P. Evans, T. Moore. Fixed dose combinations for tuberculosis: Lessons learned from clinical, formulation and regulatory perspective // Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2004. V. 26(9). P. 703–721.
11. C.S. Gautam, L. Saha. Fixed dose drug combinations (FDCs): rational or irrational: a view point // Br J Clin Pharmacol. 2008. V. 65(5). P. 795–796.
12. R. Taneja, A.J. Garcia-Prats, J. Furin, H.K. Maheshwari. Paediatric formulations of second-line anti-tuberculosis medications: challenges and considerations // Int J Tuberc Lung Dis. 2015. V. 19(12). P. 61–68.
13. C.R. Gallardo, D. Rigau Comas, A. Valderrama Rodríguez, M. Roqué i Figuls, L.A. Parker, J. Caylà, X. Bonfill Cosp. Fixed-dose combinations of drugs versus single-drug formulations for treating pulmonary tuberculosis // Cochrane Database Syst Rev. 2016. V. (5).
14. G. Sgaragli, M. Frosini, S. Saponara, F. Corelli. Human Tuberculosis. III. Current and Prospective Approaches in Anti-Tubercular Therapy // Curr Med Chem. 2016. V. 23(21). P. 2245–2274.
15. G. Brigden, J.L. Castro, L. Ditiu, G. Grey, D. Hanna, M. Low, M.P. Matsoso, G. Perry, M. Spigelman, S. Swaminathan, E. Torreele, S. Wong. Tuberculosis and antimicrobial resistance – new models of research and development needed // Bull World Health Organ. 2017. V. 95(5). P. 315.
16. C. Lienhardt, P. Nahid, M.L. Rich, C. Bansbach, E.A. Kendall, G. Churchyard, L. González-Angulo, L. D'Ambrosio, G.B. Migliori, M. Raviglione. Target regimen profiles for treatment of tuberculosis: a WHO document // Eur Respir J. 2017. V. 49(1).
17. Ю.В. Шикова, С.Н. Ивакина, А.Р. Кадыров, Е.В. Елова, О.Е. Зайцева, Т.А. Лиходед. Анализ ассортимента лекарственных препаратов для выявления и разработки нового комбинированного противотуберкулезного препарата // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. № 5(65). С. 56–60.
18. Изониазид // Регистр лекарственных средств России. URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_627.htm (дата обращения 26.08.2017).
19. Офлоксацин // Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru (дата обращения 26.08.2017).
20. ОФС.1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. URL: http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ (дата обращения 14.07.2017).
21. Патент РФ № 2622754. Драже с изониазидом и офлоксацином для лечения туберкулеза / Ю.В. Шикова, А.Р. Кадыров, В.А. Лиходед, В.В. Плечев, Е.В. Елова, О.Е. Зайцева, Е.В. Симонян. – № 2016117627/16; опубл. 19.06.2017; Бюл. № 17.

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

УДК 615.453; 661.12; 615.32

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРЕПАРАТОВ ТОРАСЕМИДА

Д.Ю. Ивкин[1]*, А.А. Теслев[1], А.С. Дзюба[2], А.С. Ивкина[1]

Резюме. В статье представлены сведения о токсикологических и фармакологических характеристиках основных вспомогательных веществ, используемых при разработке препаратов торасемида (натрия кроскармеллозы, микрокристаллической целлюлозы, магния стеарата, крахмала кукурузного прежелатинизированного, кремния диоксида коллоидного, маннитола).

Ключевые слова: торасемид, вспомогательное вещество, дженерик, безопасность, токсичность, фармацевтическая разработка.

TOXICOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EXCIPIENTS OF DRUG PRODUCTS OF TORASEMIDE

D.Yu. Ivkin[1]*, A.A. Teslev[1], A.S. Dziuba[2], A.S. Ivkina[1]

Abstract. Information on the toxicological and pharmacological characteristics of the main excipients used in the formulation of torasemide (sodium croscarmellose, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, pregelatinized corn starch, silica, mannitol) is presented in the article.

Keywords: torasemide, excipient, generic, safety, toxicity, pharmaceutical development.

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

2 – АО «Фармпроект», 192236, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Софийская, д. 14

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

2 – JSC «Pharmproject», 14, Sofijskaya str., Saint-Petersburg, 192236, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ (ВВ), одного из важнейших фармацевтических факторов, их взаимодействие с лекарственным веществом (ЛВ) и между собой являются основой для научно обоснованного выбора состава лекарственного препарата (ЛП) [1, 2].

В связи с современными представлениями о роли ВВ в составе лекарственного средства (ЛС) общим принципом при выборе ВВ является технологическая целесообразность, безопасность и совместимость с другими компонентами готовых лекарственных форм (ГЛФ) [1, 2].

С биофармацевтической точки зрения применение ВВ требует проведения информационно-аналитических и экспериментальных исследований по установлению их влияния не только на технологические и фармакопейные свойства ЛС, но и на профиль его эффективности и безопасности [1].

Обеспечение эффекта ЛВ достигается рациональным подбором и изучением всех ВВ и подходом к изучению ЛП с новым составом ВВ как к новой фармацевтической композиции [1].

В то же время при регистрации воспроизведенного ЛП, идентичного по составу уже имеющемуся на фармацевтическом рынке, при сохранении соотношения между ЛВ и ВВ есть возможность не проводить сравнительные доклинические исследования.

Поэтому оценка профиля безопасности входящих в состав компонентов, в том числе ВВ, приобретает, безусловно, важное значение [2].

Настоящая статья посвящена обзору профилей безопасности ВВ, входящих в состав препаратов торасемида, относящихся к группе петлевых диуретиков.

Долгое время ВВ считались индифферентными и безопасными. Однако накопление в научной литературе сведений об их профилях безопасности, возможной несовместимости и нестабиль-

ности требует пересмотра их роли в обеспечении эффективности и безопасности ЛС [2–4]. Поэтому в современных условиях для оценки биологической активности ВВ необходима информация о результатах исследований его фармакологической безопасности [1].

С целью обеспечения безопасности для потребителя международные токсикологические комитеты требуют проведения тщательных исследований ВВ на лабораторных животных. При этом оценивают как общие побочные эффекты ВВ, так и индивидуальные случаи непереносимости у людей, которые являются носителями инфекционных заболеваний или генетически предрасположены к развитию тех или иных патологий [5].

В составы большинства зарегистрированных препаратов торасемида в качестве ВВ входят лактоза, кросповидон, повидон, микрокристаллическая целлюлоза, магния стеарат, крахмал кукурузный, карбоксиметилкрахмал натрия, кремния диоксид коллоидный, камедь гуаровая, кроскармеллоза натрия, маннитол.

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ НАТРИЯ КРОСКАРМЕЛЛОЗЫ

Натрия кроскармеллоза, представляющая собой поперечно сшитую карбоксиметилцеллюлозу, в твёрдых ЛФ для перорального применения выполняет функцию так называемого супердезинтегранта, способствуя улучшению биофармацевтических характеристик ЛФ *in vitro*.

Кроме ЛП, входит в состав биологически активных добавок к пище и подсластителей.

Фриман и др. [6] были проведены исследования для оценки субхронической токсичности натрия кроскармеллозы. В субхроническом исследовании группы крыс Sprague-Dawley (по 20 самцов и самок в группе) получали 0 (контроль), 10000 или 50000 частей кроскармеллозы натрия на миллион в рационе в течение 90 последовательных дней (что эквивалентно 757 и 893 мг/кг/день для самцов и самок, получавших 10000 частей на миллион, и 3922 и 4721 мг/кг/день для самцов и самок, получавших 50000 частей на миллион, соответственно). Не наблюдали смертности, клинических признаков токсичности или побочных токсикологических эффектов по результатам гематологических или биохимических анализов, при потреблении корма или офтальмологических обследованиях ни в одной группе лечения. Прирост массы тела был подавлен высокими дозами у самцов во время заключительных 3 недель диеты. Связанные с лечением гистологические поражения (умеренная почечная минерализация) отмечены только у одной самки на высокой дозе. Это поражение считается не специфичным действием, а побочным эффектом в результате потенциального увеличения pH мочи и почечной экскреции натрия в связи с высоким потреблением натрия, связанного кроскармеллозой. В исследовании репродуктивной токсичности группы беременных крыс Sprague-Dawley (25 самок/группа) получали 0 (контроль), 10000 или 50000 частей кроскармеллозы натрия на миллион частей корма в рационе с 6 по 15 гестационный день. Никаких доказательств токсичности для матери, плода или эмбриотоксичности отмечено не было. Уровень дозы без неблагоприятных эффектов (NOAEL) для кроскармеллозы натрия в обоих исследованиях превышает 50000 частей на миллион в диете, что представляет дозы 3922 и 4712 мг/кг/день для самцов и самок соответственно [6]. Результаты этих исследований показывают низкую субхроническую пероральную токсичность, а также подтверждают безопасность использования кроскармеллозы натрия в производстве ЛП, пищевых добавок и подсластителей.

Пероральные и чрескожные значения $ЛД_{50}$ для крыс были выше, чем 5000 и 2000 мг/кг соответственно. $ЛД_{50}$ при вдыхании в течение 4 ч было больше, чем максимально достижимая концентрация 0,13 мг/л у крыс. Кроскармеллоза натрия произвела очень легкое раздражение кожи и глаз у кроликов [7], не вызвала сенсибилизации кожи у морских свинок. Эти результаты сходны с результатами работы по микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) [Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам, ОКЭПД, 1990], что свидетельствует о том, что оба ВВ обладают аналогичными токсикологическими свойствами.

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МИКРОКРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ

В твердых пероральных ЛФ МКЦ используется как наполнитель, в некоторых случаях – как дезинтегрант, реже – как связующее вещество.

МКЦ имеет долгую историю безопасного использования в качестве фармацевтического наполнителя и одобрена FDA США в качестве продукта с общепризнанной безопасностью (статус Generally Recognised as Safe, GRAS) [8].

Четырех крыс кормили ^{14}C-меченой МКЦ в количестве 10 или 20% от их рациона. Никаких признаков диспептических расстройств не было отмечено. Фекальная радиоактивность колебалась от 96-104%, в моче не обнаружена [9].

Следующее исследование было специально разработано для изучения возможности развития токсикологических эффектов при поглощении МКЦ. Группы самцов и самок крыс породы Sprague-Dawley CD (20 на группу) из Charles River Laboratories получали с помощью желудочного зонда 25% суспензию МКЦ в воде (средний размер частиц – 6 мкм) ежедневно в течение 90 дней подряд на уровне 5000 мг/кг веса тела. Животные были умерщвлены на 91–94 день исследования,

частицы МКЦ не были обнаружены в каком-либо органе или ткани, в том числе кишечнике лимфоидной ткани, печени, легких, селезенке и головном мозге. Предельный размер для обнаружения частиц составлял <1 мкм [10].

При исследовании на людях один человек получал 150 г МКЦ ежедневно в два приема за период адаптации длиной 15 дней. Затем он получал ^{14}C-меченую МКЦ (47,6 мКи) двумя порциями за один день. Обогащение рациона с непомеченной МКЦ продолжалось в течение 10 дней. Суточные кал и моча были исследованы на предмет радиоактивности. Радиоактивность не выявлялась в моче или в выдыхаемом CO_2, обнаруживалась (98,9±3,0%) в фекалиях в течение двух дней [11].

Было показано, что метаболизм препарата ^{14}C-меченой целлюлозы у четырёх добровольцев увеличивается при потреблении в течение 3 месяцев дополнительных 7 г/день пищевых волокон. У шести пациентов с илеостомией кумулятивная экскреция $^{14}CO_2$ была ниже, чем в контрольной группе. У двух пациентов с запором метаболизм оказался более длительным [12].

Исследование кала одного мужчины и одной женщины, получавших 30 г МКЦ в сухом виде или в виде геля в течение 5 недель, показало наличие недеградированного материала. Не наблюдалось значительного влияния на ЖКТ людей во время введения [13].

Другие проведённые исследования продемонстрировали отсутствие введённой в организм МКЦ в моче, легочных альвеолах, перитонеальной полости, спинномозговой жидкости, молоке и плаценте [14].

Среднее потребление МКЦ в пищу в США составляет от 2,7 г на человека в день (дети 2 лет) до 5,1 г на человека в день (молодые взрослые мужчины) [15], а в Великобритании – 0,90–1,83 г на человека в день [16].

Крысы, свиньи и собаки использовались для изучения сорбции МКЦ. Животных не кормили в течение 12 ч до перорального введения исследуемого соединения. Крысы, собаки и свиньи получили по 0,5, 140 и 200 г тестируемого соединения соответственно. Венозную кровь брали у животных через 1–2 ч после введения испытуемого соединения и исследовали на частицы. Наличие частиц было продемонстрировано в крови всех трех видов. Средний максимальный диаметр адсорбированных частиц у крыс был больше, чем у собаки или свиньи [17].

Перорально введённые микросферы МКЦ диаметром 1-10 мкм были специально рассмотрены в ткани кишки мышей линии BALBc. Те, что были больше или равны 5 мкм, остались в пейеровых бляшках; те, что были <5 мкм, попали в брыжеечные лимфатические узлы и селезенку [18].

Результаты исследований острой токсичности различных препаратов на основе МКЦ приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Острая токсичность МКЦ у крыс

Пол	Путь введения	LD_{50}, мг/кг	Исследование
Самцы	Пероральный, внутрибрюшинный	>3160	[19]
Самцы и самки	Пероральный	>5000	[20, 21]
Самцы и самки	Накожный	>2000	[22, 23]
Самцы и самки	Ингаляционный	>5,35 мг/л	[24]

В исследованиях, приведенных в таблице 1, отсутствуют доказательства токсичности препаратов МКЦ, введённых перорально или накожно, для крыс в дозах 5000 или 2000 мг/кг веса тела. Наблюдения при аутопсии у животных, получавших внутрибрюшинно МКЦ в дозе 3160 мг/кг веса тела, свидетельствуют о реакции местного раздражения, вызванной наличием инородных материалов.

Исследование токсичности при вдыхании показали только переходные эффекты при концентрации 5,35 мг/л.

Группы по четыре самца крыс содержали на диетах, включающих 0,25, 2,5 или 25% различных съедобных целлюлоз, в течение 3 месяцев. Никаких различий не было между группами в отношении роста и характера дефекаций. Гистологическое исследование желудочно-кишечного тракта не показало связанных с лечением аномалий [25].

Три группы по пять самцов крыс получали в диете 0; 0,5 или 10% МКЦ в течение 8 недель. Рост был сравнимым с контрольной группой, но 10% группы показали немного более низкий вес тела. Гематология, биохимия и уровни витамина B_1 в крови и фекалиях не показали никаких отличий от контроля [26].

Три группы по 50 самцов и 50 самок крыс получали в рационе в течение 72 недель или 30% обычную целлюлозу, или сухую МКЦ, или гель МКЦ. Внешний вид и поведение были сравнимы во всех группах. Не было отмечено никаких побочных эффектов. Масса тела самцов, получавших гель МКЦ, была выше, чем в контрольной группе. Выживаемость и гематология были сравнимы во всех группах. Массы печени и почек самцов на геле МКЦ были выше, гистология показала некоторое дистрофическое обызвествление почечных канальцев у самок на МКЦ, но все другие органы оказались ничем не примечательны. Распространённость опухолей не отличалась между группами [27].

Группы из 8 самцов и 16 самок крыс были использованы для производства P-, F_{1a}-, F_{1b}-, F_2- и F_3-поколения, после того как их содержали на диетах с 30% муки МКЦ, или геля, или обычной целлюлозы в качестве контроля. Присутствие в рационе такого количества непитательного материала оказало неблагоприятное влияние на воспроизводство. Рождаемость и число живых крысят снизилось во всех трех поко-

лениях, также выживание и физическое состояние крысят были неудовлетворительными в течение всего исследования. При аутопсии самок крыс всех поколений наблюдали изменения в почках, представляющие собой точечную коррозию, иногда расширение и зональность коры. Другие органы не показали последовательных изменений, отсутствовал тератогенный эффект [28].

Различные препараты МКЦ были протестированы по генотоксичности в нескольких различных системах анализа. Результаты были отрицательными (обратная мутация *Salmonella typhimurium* – 50–5000 мкг/чашку, кишечная палочка – 10–5000 мкг/чашку, прямые мутации мышиной лимфомы – 100–1000 мкг/мл, первичная культура клеток печени крысы – 10–1000 мкг/мл, костный мозг млекопитающих, микроядра, эритроциты) [29–32, 33–36].

Анализируя имеющиеся токсикологические данные, можно сделать вывод о том, что приём МКЦ в качестве пищевого продукта безопасен.

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ МАГНИЯ СТЕАРАТА

Магния стеарат применяют в качестве лубриканта, снижающего трение на контактных участках при прессовании.

Исследование субхронической токсичности проведено на подопытных животных (крысах): магния стеарат давали в группах по 20 самцов и 20 самок в количестве 0, 5, 10 и 20% в полусинтетической диете в течение 3 месяцев. Снижение увеличения массы тела было обнаружено у самцов в группе, получавшей 20% магния стеарата. Уролитиаз был выявлен у 8 самцов и 7 самок в этой же группе. Снижение относительного веса печени наблюдалось у самцов в группах с 10% и 20% магния стеарата, повышенное количество железа в печени было обнаружено у группы с 20% магния стеарата. Нефрокальциноз был снижен у самок в 20% группе. Результатом этого эксперимента стала оценка нетоксичного уровня магния стеарата в диете, который составляет 5% от рациона питания, что соответствует 2500 мг/кг/сут [37].

Исследование токсичности у крыс при пероральном, ингаляционном и накожном введении свидетельствует о минимальных токсических проявлениях (слабительный эффект при приёме высоких доз внутрь). $ЛД_{50}$ при ингаляционном введении крысам – >2 мг/л, при пероральном – >10 г/кг. Канцерогенного эффекта при имплантации в мочевой пузырь мышам не отмечено [37-40].

Как стеарат нетоксичного металла вещество не является канцерогеном для человека [41]. FDA (США) признало добавление вещества непосредственно в пищу безопасным (статус GRAS) [42].

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ КРАХМАЛА КУКУРУЗНОГО ПРЕЖЕЛАТИНИЗИРОВАННОГО

В фармацевтической промышленности крахмалы находят широкое применение в качестве связующих веществ, дезинтегрантов, наполнителей. В частности, крахмал кукурузный прежелатинизированный используют в качестве дезинтегранта, обеспечивая достижение требуемого времени распадаемости и степени высвобождения для таблетки или капсулы [43].

В пищевой промышленности крахмалы также используются в качестве загустителей или стабилизаторов [44].

Отмечают, что потребление чрезмерного количества сырого крахмала может приводить к ожирению и железодефицитной анемии у людей. Тем не менее нет никаких доказательств его опасности для общества при использовании в разумных количествах [45].

Природные полимеры, к которым относятся и крахмалы, обычно обладают низкой токсичностью, низкой иммуногенностью и высокой биосовместимостью. Так, назальные биоадгезивные микросферы крахмала со значительно расширенным временем полураспада были зарегистрированы в качестве терапевтических систем, включающих в том числе инсулин. Улучшенная биологическая доступность гентамицин-инкапсулированных микросфер на основе крахмала, а также магнитных микросфер крахмала для парентерального введения оксидов железа – тема многих исследований и статей [46].

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ КРЕМНИЯ ДИОКСИДА КОЛЛОИДНОГО (АЭРОСИЛА)

Кремния диоксид коллоидный применяется как скользящее вещество (глидант), в некоторых исследованиях отмечают возможность его использования для корректирования гигроскопичности и распадаемости [47].

Глобальное исследование было предпринято с целью изучения потенциальной токсичности и установления уровня вредного влияния и органов-мишеней для частиц различного размера кремния диоксида коллоидного, который вводили ежедневно через желудочный зонд крысам породы Sprague-Dawley в течение 90 дней. На основании результатов 14-дневного исследования были выбраны дозы: высокая доза была определена в размере 2000 мг/кг, а средние и низкие дозы были установлены на уровне 1000 и 500 мг/кг соответственно. В исследовании токсичности на 90-й день не было случаев смерти животных в связи с введением частиц SiO_2 любого размера. Кроме того, не наблюдалось никаких связанных с лечением клинических или гистопатологических изменений ни в

одной из экспериментальных групп. Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что уровень токсического воздействия превышает 2000 мг/кг, ни один орган-мишень не был идентифицирован у крыс обоего пола [48].

Точно так же Fu и др. сообщили, что введение коллоидного кремния диоксида различными путями, включая внутривенный, пероральный, подкожный и внутримышечный, не приводило к каким-либо гистопатологическим изменениям или нарушениям в печени, селезенке, почках, легких через 24 ч и 7 дней у мышей [49]. Некоторые исследования сообщают об отсутствии цитотоксичности, кремния диоксид коллоидный не проявлял цитотоксичности или генотоксичности в отношении человеческих раковых клеток [50, 51]. Гуо и др. сообщили, что внутрибрюшинное введение показало низкую токсичность, отсутствие гистопатологических изменений и влияния на биохимические показатели сыворотки крови, причём кремния диоксид коллоидный не вызывает окислительного стресса у мышей после 7 дней инъекций [52]. Другое исследование внутрибрюшинного введения у мышей показало, что воздействие коллоидного SiO_2 в течение 4 недель не оказывает никакого влияния на иммунологические показатели, такие как сывороточный иммуноглобулин G и уровни иммуноглобулинов M или число лимфоцитов селезёнки [53]. Кроме того, когда крысы подвергались введению SiO_2 в трахею, не было воздействия на маркеры окислительного стресса, в том числе на супероксиддисмутазы, индуцибельные синтазы окиси азота и циклооксигеназу 2-го типа, через 24 ч, 7 дней или 30 дней после того, как коллоид был введён [54]. Помимо этого, на основании исследования острой токсичности при внутривенном введении у крыс через 5, 21 и 60 дней Иванов и др. предположили, что коллоидный SiO_2 является биосовместимым наноматериалом [55]. Таким образом, коллоидный SiO_2 имеет положительный профиль безопасности.

БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МАННИТОЛА (МАННИТА)

Как правило, маннитол используется в составах твёрдых ЛФ в качестве наполнителя.

Объединенный комитет экспертов продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН и ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) в своем тридцатом отчете постановил не указывать величину допустимого суточного потребления для маннитола. Это означает, что маннитол признан безопасным. Данное решение было основано на результатах полного биотоксикологического исследования. Европейский научный комитет по продуктам питания (SFC) принял аналогичное решение относительно допустимого суточного потребления маннитола.

Вспомогательные вещества в составе препаратов все чаще привлекают внимание пациентов. Одной из тенденций является отказ от лактозы в составе препаратов вследствие ее непереносимости пациентами определенных групп, а в некоторых случаях – из-за её животного происхождения.

Маннитол, получаемый из сырья растительного происхождения, часто позволяет заменить лактозу в составе лекарственных препаратов.

К тому же маннитол и другие полиолы не обладают кариогенным действием, что позволяет создавать препараты с приятным сладким вкусом, употребление которых безопасно для зубов [56].

Препараты «Демадекс», «Тригрим», «Диувер», «Бритомар», «Торасемид-СЗ» несколько отличаются по составу ВВ, содержат лактозу; препарат «Торасемид Канон» содержит маннитол (таблица 2) [57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционно уделяется много внимания фармакологической активности и токсикологическим характеристикам действующего вещества, однако технология препаратов предусматривает использование ВВ. ВВ играют важную роль в общем профиле безопасности ЛС, поэтому в современных условиях необходима их токсикологическая и фармакологическая оценки.

В частности, имеющиеся данные о фармакологических, токсикологических, физико-химических и технологических характеристиках ЛВ и ВВ в препаратах обеспечивают биофармацевтически обоснованный подход к выбору состава и технологии ЛС торасемида. Данный подход позволяет разработать безопасное и эффективное диуретическое средство, отвечающее современным требованиям.

Необходимость оценки безопасности, активности и совместимости ВВ очевидна и при создании лекарственных препаратов абсолютно всех фармакологических групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.И. Тенцова, О.И. Терёшкина, И.П. Рудакова. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ // Фармация. 2012. № 7. С. 3-6.
2. М.М. Миронова, Е.Л. Ковалева. Требования к производству вспомогательных веществ, используемых в составе лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 5. С. 52–56.
3. А.П. Мешковский. Обеспечение качества фармацевтических субстанций за рубежом – сегодня и завтра // Фарматека. 2000. № 1. С. 29–34.
4. Н.Б. Демина. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1. С. 8–13.
5. G. Pifferi, P. Restani. The safety of pharmaceutical excipients // Farmaco. 2003. № 58(8). P. 541–550.
6. C. Freeman et al. Subchronic and Developmental Toxicity Studies in Rats with Ac-Di-Sol Croscarmellose Sodium // International

Таблица 2.

Использование различных вспомогательных веществ в препаратах торасемида

Вспомогательное вещество	Препарат торасемида					
	«Демадекс»[1]	«Диувер»[2]	«Тригрим»	«Бритомар»	«Торасемид-СЗ»	«Торасемид Канон»
Производитель	Roche Pharmaceuticals, США	Pliva Hrvatska d.o.o., Республика Хорватия	Polpharma, Польша	«Феррер Интернасьональ», Испания	ЗАО «Северная звезда», Россия	ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия
Лактоза	+	+	+	+	+	–
Кросповидон	+	–	–	–	–	–
Повидон	+	–	–	–	–	–
Микрокристаллическая целлюлоза	+	–	–	–	–	+
Магния стеарат	+	+	+	+	+	+
Крахмал кукурузный прежелатинизированный	–	+	+	+	+	+
Карбоксиметилкрахмал натрия	–	+	–	–	–	–
Кремния диоксид коллоидный	–	+	+	+	+	+
Камедь гуаровая	–	–	–	+	–	–
Кроскармеллоза натрия	–	–	–	–	–	+
Маннитол	–	–	–	–	–	+

Примечание: [1]оригинальный препарат торасемида (в РФ не зарегистрирован); [2]воспроизведенный препарат «Демадекса» (первый препарат торасемида, зарегистрированный в РФ).

Journal of Toxicology. 2003. V. 22. P. 149–157.

7. M. Weiner, L.A. Kotkoskie, C. Freeman, K.J. Batt, M.J. Fletcher. Acute toxicity evaluation of Ac-Di-Sol and Avicel PH, Avicel RC and CL: pharmaceutical excipients // Toxicol Lett (Suppl). 1992. V. 243.
8. U.S. United States Food and Drug Administration (U.S. FDA). Good laboratory practice regulations; final rule. 21 CFR Part 58. – Washington, DC: U.S. FDA. 1987.
9. E.M. Baker. Microcrystalline cellulose: oral administration. – Rats. Unpublished report from Fitzsimmons General Hospital (Submitted to WHO by FMC Corporation). 1966.
10. L.A. Kotkoskie, M.T. Butt, E. Selinger, C. Freeman, M.L. Weiner. Qualitative investigation of uptake of fine particle size microcrystalline cellulose following oral administration in rats // J. Anat. 1996. V. 189. P. 531–535.
11. E.M. Baker. Microcrystalline cellulose: oral administration. – Humans. Unpublished report from Fitzsimmons General Hospital. 1968.
12. M.P. Walters, J. Kelleher, J.M. Findlay, S.T. Srinivasan. Preparation and characterisation of a [14C] cellulose suitable for human metabolic studies // Br. J. Nutr. 1989. V. 62. P. 121–129.
13. T.W. Tusing, O.E. Paynter, O.A. Battista. Birefringence of plant fibrous cellulose and microcrystalline cellulose in human stools freezer-stored immediately after evacuation // Agric. Food Chem. 1964. № 12(3). P. 284–287.
14. G. Volkheimer, F.H. Schultz, H. Lehmann, I. Aurich, R. Hubner, M. Hubner, A. Hallmayer, H. Munch, H. Opperman, S. Strauch. Primary portal transport of persorbed starch granules from the intestinal wall // Med. Exp. 1968. V. 18. P. 103–108.
15. CanTox Inc. Estimated consumption of microcrystalline cellulose and sodium carboxymethylcellulose from current and proposed food use of Avicel cellulose gel. Unpublished report dated December 1993, prepared by CanTox Inc. for FMC Corporation (Submitted to WHO by FMC Europe N.V.). 1993.
16. S.K. Egan, J.T. Heimbach, Microcrystalline cellulose, MCC, E460(i). Part four: Exposure data – Estimated intake of MCC in the United Kingdom. Unpublished report dated April 11, 1994, prepared by TAS, Inc., Washington, DC, USA for FMC Corporation (Submitted to WHO by FMC Europe N.V). 1994.
17. G. Pahlke, R. Friedrich. Persorption of microcrystalline cellulose // Naturwissenschaften. 1974. V. 61. P. 35.
18. J.H. Eldridge, R.M. Gilley, J.K. Staas, Z. Moldoveanu, J.A. Meulbroek, T.R. Tice. Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral immunization // Curr. Top. Microbiol. Imunol. 1989. V. 146. P. 59–66.
19. A.J. Pallotta. Acute oral administration – Rats; and acute intraperitoneal administration – Rats, of microcrystalline cellulose. Unpublished report from Hazleton Labs, Inc. (Submitted to WHO by FMC Corporation). 1959.
20. C. Freeman. Avicel RCN-15. Acute oral toxicity study in rats. Unpublished report No. I91-1217 from FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA (Submitted to WHO by FMC Europe N.V.). 1991a.
21. C. Freeman. Avicel AC-815. Acute oral toxicity study in rats Unpublished report No. I95-2040 from FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA (Submitted to WHO by FMC Europe. 1996d.
22. C. Freeman. Avicel AC-815. Acute dermal toxicity study in rats. Unpublished report No. I95-2041 from FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA (Submitted to WHO by FMC Europe N.V.). 1996e.
23. C. Freeman. Avicel RCN-15. Acute dermal toxicity study in rats. Unpublished report No. I91-1219 from FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA (Submitted to WHO by FMC Europe N.V.). 1991b.

24. J. Signorin. Avicel AC-815. Acute inhalation study in rats. Unpublished report No. I95-2045 by FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA (Submitted to WHO by FMC Europe N.V.). 1996.

25. J.W. Frey, E.R. Harding, T.R. Helmbold. Dietetic investigations of edible pure cellulose // Med. J. Rec. 1928. V. 127. P. 585–589.

26. Asahi Chemical Industry Co. Effect of ingestion of avicel-contained foods on living organisms. Unpublished report from Yoshitoshi Internal Seminar (Submitted to WHO by Asahi Chemical Industry Co., Ltd). 1966.

27. Hazleton Labs. Long-term nutritional balance study – Rats. Unpublished report from Hazleton Labs, Inc. (Submitted to WHO by FMC Corporation). 1963.

28. Hazleton Labs Microcrystalline cellulose: reproduction study – Rats. Unpublished report from Hazleton Labs, Inc. (Submitted to WHO by FMC Corporation). 1964.

29. K.J. Batt. Avicel RCN-15 – Salmonella mammalian microsome plate incorporation assay (Ames test). Unpublished report No. I91-1214 from FMC Corporation Toxicology Laboratory, Princeton, New Jersey, USA. 1992.

30. M.A. Cifone. Mutagenicity test on Avicel RCN-15 in the L5178Y TK+/- mouse lymphoma forward mutation assay with an independent repeat. Unpublished report by Hazleton Washington Inc., Vienna. Virginia, USA (FMC Study No. 191-1230). 1992.

31. M.A. Cifone. Mutagenicity test on Avicel CL-611, E329N in the L5178Y TK+/- mouse lymphoma forward mutation assay with a confirmatory assay. Unpublished report by Hazleton Washington Inc., Vienna,Virginia, USA (FMC Study No. 194-1834). 1994.

32. T.E. Lawlor. Mutagenicity test with Avicel AC-815 in the Salmonella-Escherichia coli/mammalian microsome reverse mutation assay with a confirmatory assay. Unpublished report by Corning Hazleton Inc., Vienna, Virginia, USA (FMC Study No. I95-2047). 1996.

33. M.E. McKeon. Genotoxicity test on Avicel RCN-15 in the assay for unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures with a confirmatory assay. Unpublished report by Hazleton Washington Inc., Kensington, Maryland, USA (FMC Study No. I91-1229). 1992.

34. H. Murli. Mutagenicity test on Avicel RCN-15 in vivo micronucleus assay. Unpublished report by Hazleton Washington Inc., Kensington, Maryland, USA (FMC Study No. I91-1228). 1992.

35. H. Murli. Mutagenicity test on Avicel pH101 Pharmaceutical in an in vivo mouse micronucleus assay. Unpublished report by Hazleton Washington, Inc., Vienna, Virginia, USA (FMC Study No. I94-1837). 1994a.

36. H. Murli. Mutagenicity test on Avicel CL-611 in an *in vivo* mouse micronucleus assay. Unpublished report by Hazleton Washington, Inc., Vienna, Virginia, USA (FMC Study No. I94-1835). 1994b.

37. D. Søndergaard, O. Meyer, G. Würtzen. Magnesium stearate given perorally to rats. A short term study // Toxicology. 1980. № 17(1). P. 51–55.

38. E. Boyland, E.R. Busby, C.E. Dukes, P.L. Grover, D. Manson. Further experiments on implantation of materials into the urinary bladder of mice // Br J Cancer. 1964. V. 13. P. 575–581.

39. Z.T. Chowhan, W.L. Paul, L.T. Grady. Harmonization of Excipient Standards and Test Methods: Challenges and Progress // Pharma Tech. 1994. № 18(6). P. 78–96.

40. Final Report of the Safety Assessment of Lithium Stearate, Aluminum Distearate, Aluminum Stearate, Aluminum Tristearate, Ammonium Stearate, Calcium Stearate, Magnesium Stearate, Potassium Stearate, Sodium Stearate, and Zinc Stearate/International Journal of Toxicology. Published January 1, 1990.

41. American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH, 2008.P. 52.

42. 21 CFR 184.1440; U.S. National Archives and Records Administration's Electronic Code of Federal Regulations. Available from, as of October 22, 2002. URL: http://www.gpoaccess.gov/ecfr/ (дата обращения 19.08.2011).

43. R.H. Dave. Overview of pharmaceutical excipients used in tablets and capsules. Drug Topics (online). Advanstar. 10/24/2008. URL: http://drugtopics.modernmedicine.com/drugtopics/Top+News/Overview-of-pharmaceutical-excipients-used-in-tabl/Article Standard/Article/detail/561047. (дата обращения 19.08.2011).

44. D.A Bender. Starch, Pregelatinized. A Dictionary of Food and Nutrition. 2005. Retrieved March 19, 2012. URL: http://www.encyclopedia.com/doc/1O39-starchpregelatinized.html (дата обращения 19.08.2011).

45. FDA's SCOGS database; Wheat Starch; SCOGS-Report Number: 115; URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogsListing&id=365 (дата обращения 19.03.2012).

46. D.B. Le Corre, J. Bras, A. Dufresne. Starch Nanoparticles: A Review // Biomacromolecules. 2010. № 11(5). P. 1139–1153.

47. М.В. Ходжава, Н.Б. Дёмина, С.А. Скатков, В.А. Кеменова. Влияние скользящих веществ на качество таблетированных лекарственных средств // Фармация. 2011. № 7. С. 31–34.

48. Y. Kim et al. Toxicity of colloidal silica nanoparticles administered orally for 90 days in rats // International Journal of Nanomedicine. 2014. № 9 (Suppl 2). P. 67–78.

49. C. Fu, T. Liu, L. Li, H. Liu, D. Chen, F. Tang. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes // Biomaterials. 2013. № 34(10). P. 2565–2575.

50. C.A. Barnes, A. Elsaesser, J. Arkusz et al. Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity // Nano Lett. 2008. № 8(9). P. 3069–3074.

51. J.S. Chang, K.L. Chang, D.F. Hwang, Z.L. Kong. In vitro cytotoxicitiy of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line // Environ Sci Technol. 2007. № 41(6). P. 2064–2068.

52. M. Guo, X. Xu, X. Yan, S. Wang, S. Gao, S. Zhu. In vivo biodistribution and synergistic toxicity of silica nanoparticles and cadmium chloride in mice // J Hazard Mater. 2013. V. 260. P. 780–788.

53. S. Lee, M.S. Kim, D. Lee et al. The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice // Int J Nanomedicine. 2013. V. 8. P. 147–158.

54. T. Coccini, E. Roda, S. Barni, C. Signorini, L. Manzo. Long-lasting oxidative pulmonary insult in rat after intratracheal instillation of silica nanoparticles doped with cadmium // Toxicology. 2012. № 302(2–3). P. 203–211.

55. S. Ivanov, S. Zhuravsky, G. Yukina, V. Tomson, D. Korolev, M. Galagudza. In vivo toxicity of intravenously administered silica and silicon nanoparticles // Materials. 2012. № 5(10). P. 1873–1889.

56. Маннитол PEARLITOL® – основа для создания фармацевтических препаратов высокого качества // Фармацевтическая отрасль. 2016. № 1(54). С. 66–70.

57. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://www.grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR= %D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B5%D0%BC%D0%B8%D0%B4&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=1&regtype=&pageSize=10&order=RegDate&orderType=desc&pageNum=1 (дата обращения 27.10.2017).

COPLEY SCIENTIFIC

ТЕСТИРОВАНИЕ ОРАЛЬНО-ИНГАЛЯЦИОННЫХ И НАЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

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



Насос HCP5, устройство DUSA MDI и контроллер потока TPK2000

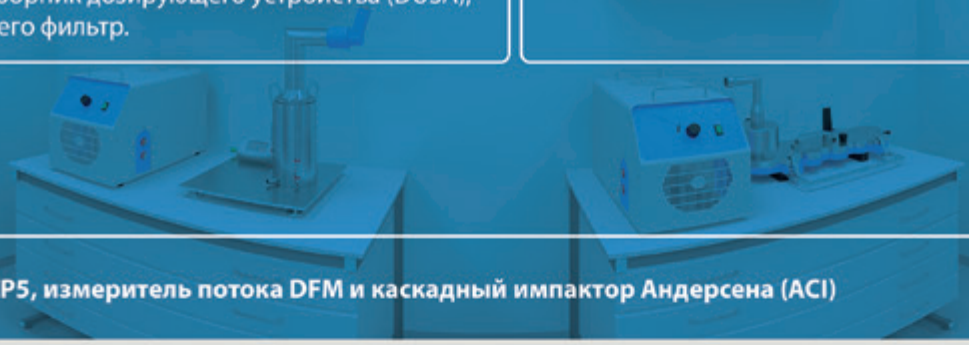
Параметр «доставленная доза» измеряется путем перемещения аэрозоля из тестируемого устройства в пробоотборник дозирующего устройства (DUSA), содержащего фильтр.

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



Насос HCP5 и стеклянный жидкостный импинжер Copley Scientific GTI

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



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



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

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

Pharmcontract group of companies
ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ
+7 (495) 252-00-98 (ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
8 800 333-69-11 (БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct.ru
info@phct.ru

УДК 615.451.35.015.3

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АЭРОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЭРОЗОЛЕЙ САЛЬБУТАМОЛА

Н.А. Ляпунов[1]*, Е.П. Безуглая[1], В.А. Бовтенко[1], Ю.М. Столпер[1]

Резюме. Исследованы аэродинамические свойства разработанного препарата-дженерика *«Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* и препарата *«Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* на приборах A, C, D и E в соответствии с общей статьёй 2.9.18 Европейской Фармакопеи. Показана эквивалентность *in vitro* препарата-дженерика и препарата сравнения по таким аэродинамическим характеристикам, как доза мелкодисперсных частиц, распределение частиц по размерам, относительное количество сальбутамола, прошедшего ступени приборов, средний аэродинамический диаметр массы (MMAD) и геометрическое стандартное отклонение (GSD). Показано, что прибор A целесообразно использовать для контроля респирабельной фракции, а приборы D и E – для определения распределения частиц по размерам, MMAD и GSD.

Ключевые слова: сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, импинджер, импактор, доза мелкодисперсных частиц, распределение частиц по размерам.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF AERODYNAMIC PROPERTIES OF SALBUTAMOL PRESSURIZED METERED DOSE INHALERS

N.A. Lyapunov[1]*, E.P. Bezuglaya[1], V.A. Bovtenko[1], Yu.M. Stolper[1]

Abstract. The aerodynamic properties of the developed generic product Salbutamol metered dose inhaler 100 μg/dose and Salbutamol-Teva metered dose inhaler 100 μg/dose using apparatuses A, C, D and E in accordance with the general article 2.9.18 of the European Pharmacopoeia have been studied. In vitro equivalence of the generic product and the comparator with regard to such aerodynamic characteristics as the fine particle dose, the particle size distribution, the relative amount of salbutamol passed through the apparatus stages, the mass median aerodynamic diameter (MMAD), and the geometric standard deviation (GSD) has been shown. It is shown that the device A is useful for testing of the respirable fraction, and the apparatuses D and E are suitable for the assessment of the particle size distribution, MMAD and GSD.

Keywords: salbutamol, pressurized metered dose inhaler, impinger, impactor, fine particle dose, particle size distribution.

1 – ГНУ «Институт монокристаллов» НАН Украины, 61072, Украина, г. Харьков, пр. Науки, д. 60

1 – Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, 60, Nauki av., Kharkiv, 61072, Ukraine

*** адресат для переписки:**
E-mail: lyapunov.na@gmail.com
Тел.: +38 067 578 35 77

ВВЕДЕНИЕ

При вдыхании аэрозолей для ингаляций оседание аэрозольных частиц в разных отделах дыхательного тракта зависит от их размера [1] и коррелирует с оседанием частиц на разных ступенях прибора D, описанного в общей статье 2.9.18 «Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles» Европейской Фармакопеи [2]. Эта корреляция представлена на рисунке 1 [3].

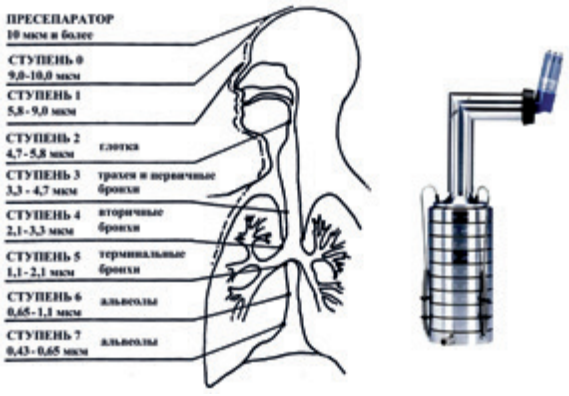


Рисунок 1. Корреляция между размерами частиц ингаляции, их осаждением в различных отделах дыхательного тракта и на ступенях прибора D

Как следует из рисунка 1, фракции частиц с размерами более 5,8 мкм оседают во рту, что соответствует оседанию на пресепараторе, ступенях 0 и 1 прибора D; фракция с размером частиц от 4,7 мкм до 5,8 мкм оседает в глотке и на ступени 2 прибора D. Эти фракции проглатываются и не достигают своих мишеней в нижней части лёгких. Фракции с размерами частиц от 3,3 мкм до 4,7 мкм оседают в трахее и первичных бронхах, что соответствует оседанию на ступени 3; фракции с размерами частиц от 2,1 мкм до 3,3 мкм оседают во вторичных бронхах и на ступени 4, от 1,1 мкм до 2,1 мкм – в терминальных бронхах и на ступени 5, от 0,43 мкм до 1,1 мкм – в альвео-

лах и на ступенях 6 и 7. На фильтре (ступень 8) оседают частицы с диаметром менее 0,4 мкм. Очень мелкие частицы, имеющие размеры менее 0,4–1,0 мкм, предположительно, могут покидать лёгкие вместе с выдыхаемым воздухом. Таким образом, гарантированный терапевтический эффект оказывает фракция мелкодисперсных частиц с размерами от 4,7 мкм до 1,1 мкм, которые осаждаются на ступенях 3–5, хотя при определении суммарной респирабельной фракции, видимо, следует учитывать и фракции со ступеней 6–8.

Поскольку терапевтическое действие зависит от размера частиц аэрозолей, в нормативном документе EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr. «Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products» [4] указано, что при фармацевтической разработке препаратов для ингаляции в форме дозированных ингаляторов под давлением необходимо исследовать количество мелкодисперсных частиц в одной дозе и распределение частиц/капель по размерам, а в спецификации следует нормировать количество мелкодисперсных частиц, то есть респирабельную фракцию. Испытание в отношении количества мелкодисперсных частиц должно быть проведено с использованием валидированного метода на многоуровневом импакторе или импинджере либо надлежащим образом валидированного альтернативного метода, например с помощью двухкамерного стеклянного импинджера (прибора А), рекомендовавшегося в монографии «Salbutamol Pressurised Inhalation» Британской Фармакопеи [5]. Если определения только количества мелкодисперсных частиц недостаточно, могут быть приемлемы дополнительные критерии, например пределы для среднего аэродинамического диаметра массы (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD) и геометрического стандартного отклонения (Geometrical Standard Deviation, GSD) [4]. Может быть необходимым контроль распределения частиц с размером более 5 мкм в зависимости от значимости этой нереспирабельной фракции для терапевтического индекса препарата.

В случае сокращённого регистрационного досье на препарат-дженерик в форме ингаляции под давлением, которое не содержит результатов клинических испытаний, для оценки эквивалентности препарата-дженерика относительно референтного препарата считают приемлемым использование данных сравнительных исследований *in vitro*, полученных с использованием многоступенчатого импактора/импинджера (при условии, что разработанный препарат-дженерик соответствует другим установленным критериям относительно референтного препарата) [6]. Следует привести данные о полном профиле распределения частиц по размерам на отдельных ступенях многоступенчатого прибора с использованием валидированного метода анализа. Эффективность и безопасность лекарственного препарата зависит от количества действующего вещества, достигающего лёгких, и от его распределения на местах осаждения. Кроме того, безопасность будет зависеть от скорости и степени системной абсорбции из желудочно-кишечного тракта глотаемой фракции. Поэтому сравнение *in vitro* следует осуществлять не только для тех ступеней, на которых оседают мелкодисперсные частицы, а также для верхних ступеней импакторов или импинджера, на которых оседают частицы, осаждаемые во рту и глотке и проглатываемые пациентом. Их количество также имеет отношение к эффективности и безопасности препарата *in vivo*. Сравнение должно быть проведено для каждой ступени прибора или для обоснованной группы ступеней. Как минимум предполагается 4 группы ступеней. Обоснование должно основываться на ожидаемых местах осаждения в лёгких. Допустимой и обоснованной разницей при исследованиях *in vitro* считается ±15%. На основании соответствия критериям приемлемости может быть сделано заключение об эквивалентности *in vitro* [6].

В общей статье 2.9.18 «Preparations for Inhalation: Aerodynamic Assessment of Fine Particles» Европейской Фармакопеи [2] описаны 4 разных прибора для аэродинамического определения мелкодисперсных частиц: прибор А – двухкамерный стеклянный импинджер, прибор С – многоступенчатый жидкостный импинджер с пресепаратором (L-образной трубкой) и 4 ступенями, прибор D – каскадный импактор Андерсена с пресепаратором и 8 ступенями, прибор Е – каскадный импактор с пресепаратором, 7 ступенями и сборником с микроотверстиями (Micro-Orifice Collector, MOC). Как следует из таблицы 1, оценка количества мелкодисперсных частиц и их распределения по размерам при использовании разных приборов может быть неоднозначной, что требует научно обоснованного выбора приборов для фармацевтической разработки и для рутинного анализа дозированных препаратов для ингаляции под давлением (дозированных аэрозолей для ингаляций).

Целью настоящего исследования явилось сравнительное определение аэродинамических характеристик двух препаратов сальбутамола в форме дозированных аэрозолей для ингаляций 100 мкг/доза с помощью разных приборов и оценка возможности применения каждого прибора для определения разных аэродинамических характеристик, а также оценка эквивалентности *in vitro* разработанного препарата-дженерика и зарегистрированного препарата сравнения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы лабораторной серии 10315 разработанного нами препарата-дженерика *«Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* (годен до 03.18) и препарата сравнения *«Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* (производитель – «Нортон Вотерфорд», выступающий под торговым наименованием «Айвэкс Фармасьютикалс Ирландия», серия AET46A,

Таблица 1.

Распределение частиц по размерам (D) на ступенях разных приборов [2]

Прибор A		Прибор C		Прибор D		Прибор E	
№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм
1	>5	1	–	0	>9,0	1	>11,72
2	≤5	2	>9,62	1	5,8–9,0	2	6,40–11,72
		3	4,38–9,62	2	4,7–5,8	3	3,99–6,40
		4	2,40–4,38	3	3,3–4,7	4	2,30–3,99
		5 (фильтр)	≤2,40	4	2,1–3,3	5	1,36–2,30
				5	1,1–2,1	6	0,83–1,36
				6	0,7–1,1	7	0,54–0,83
				7	0,4–0,7	8 (МОС)	≤0,54
				8 (фильтр)	≤0,4		

произведён 05.2015, годен до 05.2018) [7]. Препараты содержат сальбутамола сульфат микронизированный в виде суспензии в количестве 100 мкг в номинальной дозе (в пересчёте на 100% сухое вещество сальбутамол), этанол безводный и пропеллент норфлуран [2]. В препарате сравнения в качестве компонента первичной упаковки используют клапан с объёмом дозирующей камеры ~28 мкл, а в препарате-дженерике – 25 мкл.

Распределение частиц по размерам микронизированного сальбутамола сульфата, использованного для изготовления препарата-дженерика, определяли методом лазерной дифракции на лазерном дифракционном анализаторе частиц Shimadzu SALD-2201 (Shimadzu, Япония) [2]. Для приготовления суспензии использовали этанол безводный, в котором сальбутамола сульфат практически нерастворим (1 : 11000, 91 мкг/мл при температуре 25 °С) [2]. Результаты определения распределения частиц по размерам представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Размеры частиц сальбутамола сульфата микронизированного

Наибольший размер (D) частиц (мкм) во фракции:								
10% D	20% D	30% D	40% D	50% D	60% D	70% D	80% D	90% D
1,108	1,359	1,584	1,782	2,004	2,252	2,537	2,950	3,621

Примечание. 10% D – максимальный размер частиц во фракции с наименьшим диаметром частиц, составляющей 10% от общего числа частиц; 20% D – наибольший размер частиц во фракции, составляющей 20% от общего числа частиц, и т.д.

Как видно из таблицы 2, 50% частиц сальбутамола сульфата имели диаметр 2,004 мкм, а 90% – 3,621 мкм. Основная масса частиц (97,816%) имела размер до 4,936 мкм, а 99,975% частиц – не более 9,219 мкм. Вероятность присутствия частиц размером более 10 мкм очень незначительна. Как правило, в микронизированных субстанциях для ингаляционных препаратов в виде суспензий 95% частиц должны иметь размер ≤5 мкм, а 99 % частиц – ≤10 мкм.

Количественное определение сальбутамола проводили на хроматографе Shimadzu LC20 в следующей комплектации: УФ-детектор SPD-20AV, термостат CTO-20AC, автосамплер SIL-20A, насосы, дегазатор DGU-20A3R, контроллер CBM-20A Lite – по разработанной и валидированной нами методике [8].

Распределение частиц по размерам и/или дозу мелкодисперсных частиц (ДМДЧ) определяли по методологии, изложенной в общей статье 2.9.18 с использованием приборов A, C, D и E [2]. Ламинарный поток воздуха создавали вакуумным насосом ERWEKA Vacuum Pump Type VP 1000, а скорость потока воздуха устанавливали при помощи измерителя скорости потока DFM 2.

Величины MMAD рассчитывали в соответствии с общей статьёй 601 «Aerosols, nasal sprays, metered-dose inhalers, and dry powder inhalers» USP 36 [9] по графикам зависимости относительного количества сальбутамола (относительно величины осаждённой суммарной фракции), прошедшего ступени многоуровневых приборов, от эффективного размера частиц, осевших на этих ступенях (рисунок 6) [2, 9]. Значения GSD рассчитывали по этим же графикам (рисунок 6) как корень квадратный отношения диаметра частиц, соответствующих 84,13% от суммарной фракции сальбутамола, к диаметру частиц, соответствующих 15,87% от суммарной фракции сальбутамола, по формуле [4]:

$$GSD=\left(\frac{D84,13\%}{D15,87\%}\right)^{1/2}.$$

Среднюю доставляемую дозу определяли по методике, изложенной в общей статье «Preparations for Inhalation» Европейской Фармакопеи [2], с использованием дозировочного устройства ERWEKA DUSA-MDI, вакуумного насоса ERWEKA HVP 1000 и расходомера типа DMF 2 (ERWEKA, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перед определением ДМДЧ на приборе A в соответствии с рекомендациями общей статьи 2.9.18 Европейской Фармакопеи [2] для гарантии достоверности результатов определяли баланс масс; суммарное ко-



Тестер для дозирования аэрозолей в ингалятор ERWEKA DUSA-MDI

личество сальбутамола в двух камерах должно быть не менее 75% и не более 125% от средней доставляемой дозы. Для препарата-дженерика средняя доставляемая доза сальбутамола составила 85,47 мкг при относительном стандартном отклонении (RSD) 6,79%. Общее количество сальбутамола, осевшего в двух камерах стеклянного импинджера, в пересчёте на одну дозу в среднем составило 87,54 мкг, то есть 102,4% от доставляемой дозы, что удовлетворяет критериям приемлемости [2].

Для препарата сравнения средняя доставляемая доза сальбутамола составила 86,89 мкг при RSD=6,30%. Её относительное отличие от средней доставляемой дозы сальбутамола для препарата-дженерика было равно 1,6%, что значительно меньше допускаемого относительного отличия (±15%) при определении эквивалентности *in vitro*.

Результаты определения на приборе А ДМДЧ сальбутамола для препарата сравнения и препарата-дженерика представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты определения ДМДЧ сальбутамола на приборе А

№ п/п	№№ доз	ДМДЧ, мкг		Δ, %
		Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль	
1	3–12	67,09	70,75	+5,46
2	101–110	64,33	68,35	+6,25
3	191–200	62,14	66,40	+6,86
Среднее значение ДМДЧ		**64,52**	**68,50**	**+6,17**
Критерий приемлемости [5]		Не менее 35%		

Примечание: Δ – здесь и далее относительное отличие по сравнению с результатом, полученным для препарата сравнения.

По мере опорожнения баллонов для обоих препаратов в нижней камере прибора А осаждалось стабильно большое количество мелкодисперсных частиц сальбутамола; в среднем ДМДЧ сальбутамола для разработанного препарата-дженерика составила 68,50 мкг или 68,50% от номинальной дозы 100 мкг, а для препарата сравнения – 64,52 мкг (таблица 3). Это существенно выше критерия приемлемости, который составляет ≥35% от номинальной дозы [5]. Относительное отличие средней величины ДМДЧ препарата сравнения и препарата-дженерика составило всего лишь 6,17% [6].

Прибор А имеет 2 камеры, поэтому он подходит для определения суммарной ДМДЧ, а распределение частиц по размерам можно определить с помощью многоступенчатых приборов C, D и E. Как следует из таблицы 1, мелкодисперсные частицы, имеющие размеры ≤5 мкм, в случае многоступенчатых приборов частично осаждаются на одной из ступеней вместе с частицами нереспирабельной фракции размером >5 мкм. Для прибора C это ступень 3, для прибора D – ступень 2, а для прибора E – ступень 3. Это надо учитывать при стандартизации ДМДЧ и выборе прибора для её рутинного контроля. В данном исследовании фракции частиц, осевших на указанных ступенях, при расчёте ДМДЧ не учитывали.

Результаты определения ДМДЧ и распределения частиц сальбутамола по размерам для препарата сравнения и разработанного препарата-дженерика на приборе C, а также суммарные фракции сальбутамола, прошедшие каждую ступень прибора C, представлены в таблица 4 и 5 соответственно.

Таблица 4.

Осаждение сальбутамола на ступенях прибора C

Номер ступени	Осаждённая доза сальбутамола, мкг		Δ, %
	Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль	
Пресепаратор	29,45	27,93	–5,16
1	0,63	0,59	–6,35
2	0,64	0,70	+9,38
3	0,42	0,39	–7,14
4	22,21	21,27	–4,23
5 (фильтр)	42,51	44,14	+3,83
Суммарная фракция	**95,86**	**95,02**	**–0,88**
Суммарная фракция со ступеней 4–5 (ДМДЧ)	**64,72**	**65,41**	**+1,07**

Таблица 5.

Суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени 2–5 прибора C

Номер ступени	Эффективный диаметр частиц, мкм	Суммарная фракция сальбутамола, %	
		Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль
5	2,40	64,62	66,38
4	4,38	98,39	98,36
3	9,62	99,03	98,95
2	>9,62	100,00	100,00

Примечания. 1. Расчёт в процентах проведен по отношению к суммарной фракции сальбутамола, осевшей на ступенях 2–5. Фракции, осевшие внутри L-образной трубки и на ступени 1, в расчёт не принимают [1].

2. Под номером 5 указано количество сальбутамола в процентах от суммарной фракции, осевшего на ступени 5 (фильтре); под номером 4 – количество, осевшего суммарно на фильтре и ступени 4; под номером 3 – количество, осевшее суммарно на фильтре, ступенях 4 и 3, а под номером 2 – количество, осевшее суммарно на фильтре, ступенях 4, 3 и 2.

Как следует из таблицы 4, суммарные количества мелкодисперсных частиц на ступенях 4 и 5 прибора С для препарата сравнения и препарата-дженерика составили 64,72 мкг и 65,41 мкг соответственно, что превышает критерий приемлемости ≥35 мкг [5]. Относительное отличие в величине ДМДЧ для препарата сравнения и препарата-дженерика составило +1,07%. Оба препарата также имеют практически идентичные профили прохождения сальбутамола через ступени 2–5 прибора С (таблица 5).

Следует отметить, что размер 50% частиц порошка сальбутамола сульфата микронизированного, использованного для изготовления препарата-дженерика, составляет 2,004 мкм (таблица 2). В то же время на последней ступени 5 прибора С осаждаются частицы с эффективным диаметром ≤2,40 мкм (таблица 1). То есть для данного препарата-дженерика с помощью прибора С нельзя получить информацию о распределении частиц, имеющих размер менее 2,40 мкм, которые в субстанции сальбутамола сульфата микронизированного составляют 65%.

Результаты определения на приборе D ДМДЧ и распределения частиц по размерам сальбутамола для препарата сравнения и разработанного препарата-дженерика представлены в таблице 6 и на рисунке 2, а суммарные фракции сальбутамола, прошедшие каждую ступень прибора D, – в таблице 7 и на рисунке 3.

Таблица 6.

Осаждение сальбутамола на ступенях прибора D

Номер ступени	Осаждённая доза сальбутамола, мкг		Δ, %
	Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль	
Пресепаратор	23,27	20,08	–13,71
0	0,82	0,74	–9,76
1	0,94	1,01	+7,45
2	2,33	2,54	+9,01
3	14,68	15,97	+8,79
4	32,17	30,17	–6,22
5	19,00	17,11	–9,95
6	2,34	2,11	–9,83
7	0,49	0,43	–12,24
8 (фильтр)	1,38	1,32	–4,35
Суммарная фракция	**97,42**	**91,48**	**–6,10**
Суммарная фракция со ступеней 3-8 (ДМДЧ)	**70,06**	**67,11**	**–4,21**

Как следует из таблицы 6, суммарные количества мелкодисперсных частиц, осевших на ступенях 3–8 прибора D, для препарата сравнения и препарата-дженерика составили 70,06 мкг и 67,11 мкг соответственно, что превышает критерий приемлемости ≥35 мкг [5]. Относительное отличие ДМДЧ препарата-дженерика от ДМДЧ препарата сравнения составило всего –4,21%. Оба препарата имеют практически идентичные профили распределения частиц сальбутамола на ступенях прибора D; наибольшее количество сальбутамола

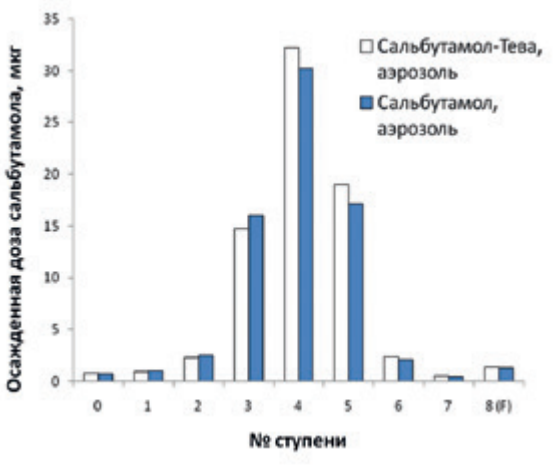


Рисунок 2. Профиль осаждения сальбутамола на ступенях прибора D

осаждается на ступенях 3, 4 и 5 (рисунок 2), что соответствует респирабельной фракции с размерами частиц от 4,7 мкм до 1,1 мкм (таблица 1). Для обоих препаратов осаждение сальбутамола максимально на ступени 4 (таблица 6, рисунок 2); частицы этой фракции имеют размеры от 2,1 мкм до 3,3 мкм (таблица 1). Практически идентичны также профили прохождения сальбутамолом ступеней 0–8 прибора D для препарата сравнения и препарата-дженерика (таблица 7, рисунок 3).

Таблица 7.

Суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени 0–8 прибора D

Номер ступени	Эффективный диаметр частиц, мкм	Суммарная фракция сальбутамола, %	
		Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль
8	0,4	1,86	1,85
7	0,7	2,52	2,45
6	1,1	5,68	5,41
5	2,1	31,30	29,37
4	3,3	74,69	71,63
3	4,7	94,48	94,00
2	5,8	97,63	97,55
1	9,0	98,89	98,96
0		100,00	100,00

Примечания. 1. Расчёт в процентах проведён по отношению к суммарной фракции сальбутамола, осевшей на ступенях 0–8. Фракцию, осевшую внутри L-образной трубки, не учитывали.

2. Под номером 8 указано количество сальбутамола в процентах от суммарной фракции, осевшее на ступени 8 (фильтре); под номером 7 – количество, осевшее суммарно на фильтре и ступени 7; под номером 6 – количество, осевшее суммарно на фильтре, ступенях 7 и 6, и т.д.

Результаты определения ДМДЧ и распределения частиц по размерам сальбутамола для препарата сравнения и препарата-дженерика на приборе Е представлены в таблице 8 и на рисунке 4, а суммарные фракции сальбутамола, прошедшие каждую ступень прибора Е, приведены в таблице 9 и на рисунке 5.

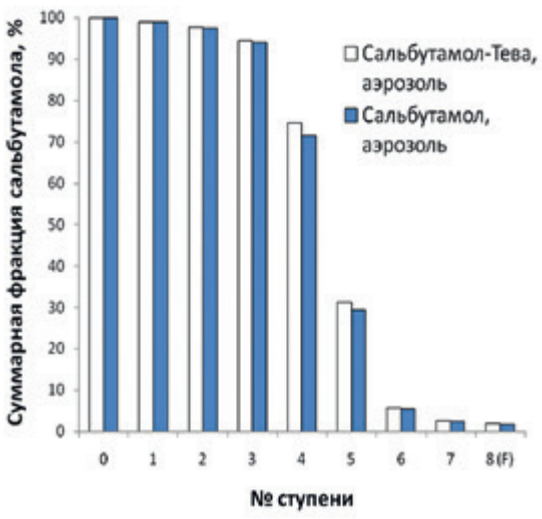


Рисунок 3. Профиль прохождения сальбутамолом ступеней прибора D (на основании данных таблицы 7)

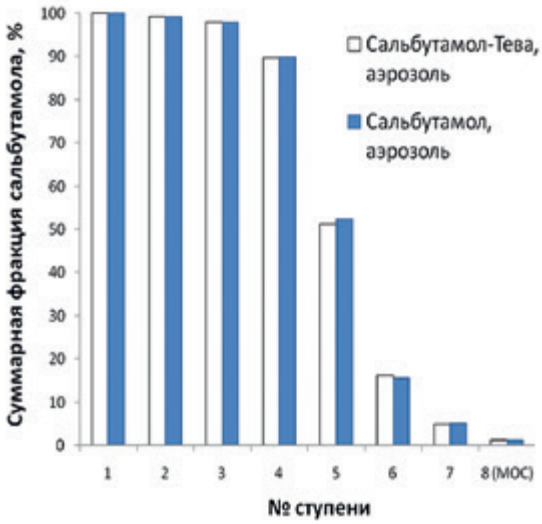


Рисунок 5. Профиль прохождения сальбутамолом ступеней прибора E (на основании данных таблицы 9)

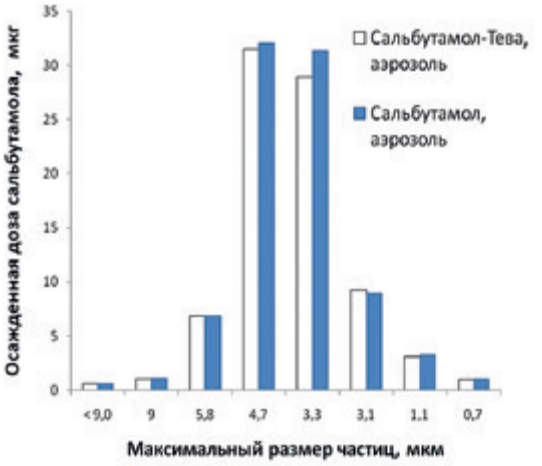


Рисунок 4. Профиль осаждения сальбутамола на ступенях прибора E

Как следует из таблицы 8, относительное отличие ДМДЧ препарата-дженерика и препарата сравнения составило +4,07%; при этом для обоих препаратов количества мелкодисперсных частиц на ступенях 4–8 прибора E существенно превышали 35 мкг [5]. Оба препарата имели практически идентичные профили распределения частиц сальбутамола на ступенях прибора E; наибольшее количество сальбутамола осаждалось на ступенях 4 и 5 (рисунок 4), что соответствует респирабельной фракции с размерами частиц от 3,99 мкм до 1,36 мкм (таблица 1). Для обоих препаратов практически идентичны были также профили прохождения сальбутамолом ступеней 1–8 прибора E (таблица 9, рисунок 5).

Таблица 8.

Осаждение сальбутамола на ступенях прибора E

Номер ступени	Осаждённая доза сальбутамола, мкг		Δ, %
	Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль	
Пресепаратор	16,46	14,09	–14,40
1	0,62	0,64	+3,23
2	1,02	1,09	+6,86
3	6,84	6,87	+0,44
4	31,53	32,07	+1,71
5	28,91	31,36	+8,47
6	9,20	8,95	–2,72
7	3,07	3,29	+7,17
8 (МОС)	0,99	1,03	+4,04
Суммарная фракция	**98,64**	**99,39**	**+0,76**
Суммарная фракция со ступеней 4–8 (ДМДЧ)	**73,70**	**76,70**	**+4,07**

Таблица 9.

Суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени 1–8 прибора E

Номер ступени	Эффективный диаметр, мкм	Суммарная фракция сальбутамола, %	
		Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль
8	0,54	1,20	1,21
7	0,83	4,94	5,06
6	1,36	16,14	15,56
5	2,30	51,31	52,32
4	3,99	89,68	89,92
3	6,40	98,00	97,97
2	11,72	99,25	99,25
1	<11,72	100,00	100,00

На рисунках 6 и 7 представлены графики, построенные по данным таблиц 5, 7 и 9, которые предназначены для расчёта MMAD и GSD.

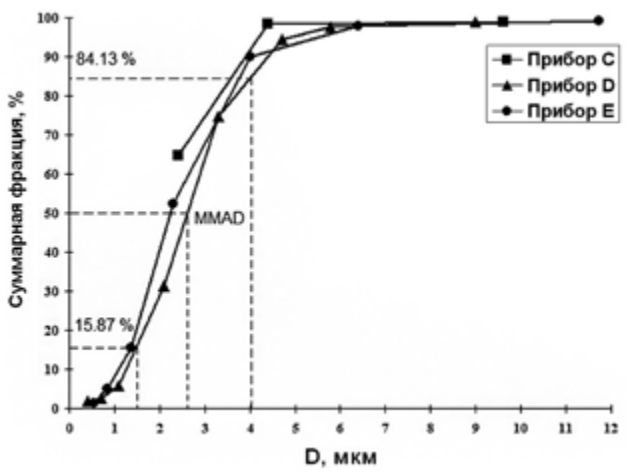


Рисунок 6. График зависимости значений относительного количества сальбутамола (относительно величины осаждённой суммарной фракции), прошедшего ступени приборов C, D и E, от эффективного размера частиц (D), осаждённых на этих ступенях, для препарата сравнения

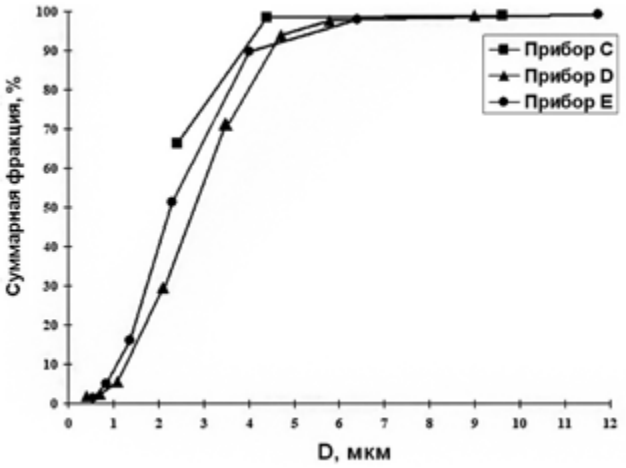


Рисунок 7. График зависимости значений относительного количества сальбутамола (относительно величины осаждённой суммарной фракции), прошедшего ступени приборов C, D и E, от эффективного размера частиц (D), осаждённых на этих ступенях, для препарата-дженерика

Как следует из рисунка 6, для исследованных препаратов по данным, полученным на приборе C, нельзя определить значения MMAD и GSD. Для этих целей можно использовать данные, полученные с помощью приборов D и E. Величины MMAD и GSD для исследованных препаратов приведены в таблицы 10.

Таблица 10.

Величины MMAD и GSD для препарата сравнения и препарата-дженерика

Наименование препарата	MMAD, мкм		GSD, %	
	Прибор D	Прибор E	Прибор D	Прибор E
Сальбутамол-Тева, аэрозоль	2,65±0,30	2,24±0,05	1,63±0,15	1,63±0,05
Сальбутамол, аэрозоль	2,70±0,30	2,26±0,05	1,60±0,15	1,67±0,05

Как следует из таблицы 10, величины MMAD и GSD, определённые с помощью прибора D и прибора E, достоверно не отличаются для препарата сравнения и препарата-дженерика. Мало отличаются величины MMAD для каждого из препаратов при их определении с помощью разных многоступенчатых импакторов (прибора D и прибора E), а величины GSD при этом оказываются практически одинаковыми (таблица 10). То есть приборы D и E можно считать взаимозаменяемыми при определении таких аэродинамических параметров, как MMAD и GSD, в то время как многоступенчатый жидкостный импинджер (прибор C) для этих целей не приемлем.

В таблице 11 обобщены данные о дозах мелкодисперсных частиц (респирабельных фракциях) сальбутамола, значения которых определены с помощью разных приборов.

Таблица 11.

Респирабельные фракции (ДМДЧ) сальбутамола, значения которых определены с помощью приборов A, C, D и E

Препарат	ДМДЧ, мкг			
	Прибор A	Прибор C	Прибор D	Прибор E
Сальбутамол-Тева, аэрозоль	64,52	64,72	70,06	73,70
Сальбутамол, аэрозоль	68,50	65,41	67,11	76,70

Как следует из таблицы 11, дозы мелкодисперсных частиц, определяемые с помощью приборов A, C и D, мало отличаются друг от друга. Максимальное относительное отличие между дозами мелкодисперсных частиц, определёнными на приборах A и D, для препарата сравнения составило 8,6%. С учётом того, что респирабельные фракции составляют 64,52 мкг и 70,06 мкг, а нижний предел равен 35 мкг (35% от номинальной дозы 100 мкг), это отличие является незначимым. Тем более что для препарата-дженерика относительное отличие ДМДЧ при определении на приборах A и D составило всего 2,0%. Эти отличия находятся в рамках вариабельности методов определения ДМДЧ. Поэтому для исследованных аэрозолей сальбутамола приборы A, C и D можно считать взаимозаменяемыми для определения суммарной ДМДЧ (респирабельной фракции) сальбутамола. Учитывая бóльшую простоту и экономичность анализов, целесообразно для рутинного определения суммарной ДМДЧ сальбутамола использовать прибор A. Если нормируют не суммарную ДМДЧ, а количество определённых фракций, то для их определения следует использовать многоступенчатый прибор D или E.

Наибольшие ДМДЧ получены при использовании прибора E. Относительные отличия между ДМДЧ при определении с помощью приборов A и E для препарата сравнения и препарата-дженерика составляют

14,2% и 12,0% соответственно. Однако это не исключает использования прибора E для определения количества мелкодисперсных частиц в одной дозе.

При фармацевтической разработке приборы D и E пригодны для определения распределения частиц по размерам, а также таких аэродинамических параметров, как MMAD и GSD. Приборы D и E наиболее приемлемы для определения эквивалентности *in vitro* препаратов-дженериков и соответствующих препаратов сравнения в форме дозированных аэрозолей под давлением. По результатам проведённых исследований разработанный препарат-дженерик *«Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* эквивалентен *in vitro* препарату *«Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»*. Это обусловлено соответствием не только критериям приемлемости относительно распределения частиц по размерам и доставляемой дозы сальбутамола, но и другим установленным требованиям [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы аэродинамические характеристики разработанного препарата-дженерика *«Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* по сравнению с препаратом *«Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* с использованием приборов A, C, D и E в соответствии с общей статьёй 2.9.18 Европейской Фармакопеи. Показано, что количество мелкодисперсных частиц сальбутамола из расчёта на одну дозу можно определять на всех четырёх приборах. Для рутинного определения суммарной ДМДЧ сальбутамола целесообразно использовать прибор A, а для количественного определения отдельных фракций сальбутамола – многоступенчатый прибор D или E. Для определения распределения частиц сальбутамола по размерам, а также расчёта MMAD и GSD следует использовать многоступенчатые приборы D и E, которые при исследовании аэрозолей сальбутамола оказались взаимозаменяемы. Использование прибора C для определения MMAD и GSD не приемлемо.

Разработанный препарат-дженерик *«Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»* по распределению частиц по размерам на ступенях многоуровневых приборов C, D и E, другим аэродинамическим характеристикам (ДМДЧ, MMAD и GSD), а также доставляемой дозе эквивалентен *in vitro* препарату *«Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный, 100 мкг/доза»*.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Lippmann. Regional Deposition of Particles in the Human Respiratory Tract / Comprehensive Physiology. 2011. P. 213–232.
2. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. 4016 p.
3. Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Е.К. Товмасян, Ю.М. Столпер, В.А. Бовтенко, С.Л. Дашутина. Вопросы контроля качества лекарственных средств для ингаляции // Фармаком. 2006. № 4. С. 9–16.
4. EMEA/CHMP/QWP/49313/2005 Corr. Guideline on the Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products. London, 21 June 2006.
5. Salbutamol Pressurised Inhalation // British Pharmacopoeia. 2013. V. III.
6. CPMP/EWP/4151/00 Rev. 1. Guideline on the Requirements for Clinical Documentation for Orally Inhaled Products (OIP) Including the Requirements for Demonstration of Therapeutic Equivalence between two Inhaled Products for Use in the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Adults and for Use in the Treatment of Asthma in Children and Adolescents. London, 22 January 2009.
7. Регистр лекарственных средств России. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ (дата обращения 30.10.2017).
8. Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, В.А. Бовтенко, Ю.М. Столпер. Обоснование нового подхода к оценке качества дозированных аэрозолей для ингаляций на этапе их разработки // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Сер.: Медицина. Фармация. 2016. № 5(226). Вып. 33. С. 170–179.
9. USP 36–NF 31. The United States Pharmacopeia and National Formulary 2012 – Copyright © 2012 The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 – Printed in the United States by United Book Press, Inc., Baltimore, MD. 5642 p.

УДК 661.12; 378.2

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К СПЕЦИАЛИСТУ ПО КОНТРОЛЮ И ПРОВЕДЕНИЮ ИСПЫТАНИЙ КАЧЕСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

С.А. Кедик[1,3], А.Н. Бабиков[2], Е.С. Жаворонок[1,3]*, Д.А. Ахмедова[3], Н.А. Засыпкина[3], И.Ю. Краснова[2]

Резюме. В статье рассмотрены основные подходы к разработке профессионального стандарта «Специалист по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции». Показана актуальность разработки такого стандарта в свете развития наноиндустрии и фармацевтической промышленности в России. Приведена структура проекта профессионального стандарта, а также описание трудовых функций и компетенции соответствующих специалистов.

Ключевые слова: профессиональный стандарт, уровень квалификации, обобщенная трудовая функция, трудовая функция, наноструктурированная фармацевтическая продукция, контроль качества.

DEVELOPMENT OF THE STANDARD FOR EDUCATION OF THE SPECIALIST FOR CONTROL AND TESTING THE QUALITY OF NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

S.A. Kedik[1,3], A.N. Babikov[2], E.S. Zhavoronok[1,3]*, D.A. Akhmedova[3], N.A. Zasypkina[3], I.Yu. Krasnova[2]

Abstract. The article is devoted to main approaches to the development of the professional standard «Specialist for quality control and testing of nanostructured pharmaceutical products». The structure of the Professional Standard Project is described, as well as the description of the labor functions and competences of the specialists.

Keywords: professional standard, qualification level, general labor function, labor function, nanostructured pharmaceuticals, quality control.

1 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 119571, Россия, г. Москва, пр-т. Вернадского, д. 86

2 – НПФ «Материа Медика Холдинг», 129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1

3 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) Министерства образования и науки Российской Федерации, 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

1 – CJSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Materia Medica Holding, 47/1, Trifonovskaya str., Moscow, 129272, Russia

3 – Moscow Technological University (MITHT), Ministry of education and science of the Russian Federation, 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Реализация государственной политики в области развития наноиндустрии как приоритетного направления развития науки, технологий и техники в РФ предусматривает введение новых профессий. Это, в свою очередь, вызывает необходимость разработки новых профессиональных стандартов, обеспечивающих и контролирующих подготовку соответствующих специалистов. Одним из актуальных направлений в области наноиндустрии является разработка и производство наноструктурированной фармацевтической продукции, под которой понимают биологические активные системы терапевтического назначения, один из компонентов которых представлен в форме наночастиц. Следует отметить, что в настоящее время активно разрабатываются новые наноструктурированные фармацевтические составы, хотя имеется и достаточное количество уже зарегистрированных и внедренных в медицинскую практику препаратов, например составы на основе полимер-протеиновых конъюгатов Pegasys® (Roche) для терапии гепатита С и Neulasta® (Amgen) для лечения нейтропении, а также липосомальный препарат Caelyx® (Schering-Plough) для лечения онкологических заболеваний. Для адекватного контроля качества новых наноструктурированных фармацевтических препаратов в соответствии с современными требованиями и согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года [1] должна быть налажена опережающая подготовка и пере-

подготовка специалистов подобного профиля, работающих в соответствии с требованиями GMP.

Учитывая эти обстоятельства, НПФ «Материа Медика Холдинг» совместно с ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ) и ЗАО «Институт фармацевтических технологий» по поручению Фонда инфраструктурных и образовательных программ (РОСНАНО) разрабатывают профессиональный стандарт по подготовке специалистов по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ ПРОЕКТА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА

В представленном в экспертный совет проекте профессионального стандарта отражены требования к различным уровням квалификации и компетенции специалистов по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции. При описании различных трудовых функций и конкретных трудовых действий учтены компетенции, права и обязанности работников в области контроля и проведения испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции. Проект профессионального стандарта разработан на основе требований Трудового кодекса Российской Федерации и профессионально-квалификационных справочников в соответствии с макетом профессионального стандарта [2], утвержденным Министерством труда [3], соответствует положениям [4, 5] и содержит следующие разделы.

1. Общие сведения.
2. Описание трудовых функций, входящих в профессиональный стандарт (функциональная карта вида профессиональной деятельности).
3. Характеристика обобщенных трудовых функций.
4. Сведения об организациях-разработчиках профессионального стандарта.

В проекте стандарта выделены основные цели профессиональной деятельности специалистов по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции. Особенности, связанные со спецификой конкретной деятельности, учтены при формулировании обобщенных трудовых функций, в которых далее выделены частные трудовые функции, представляющие собой совокупность определенных трудовых действий, необходимых для их выполнения, а также компетенции, определяемые знаниями, умениями и уровнем самостоятельности.

Проект профессионального стандарта «Специалист по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции» предполагает, что основной задачей специалистов по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции является обеспечение высокого уровня качества и безопасности выпускаемых лекарственных средств. Необходимо учитывать, что наноструктурированная фармацевтическая продукция имеет специфику, связанную с размером и поведением наночастиц, что находит отражение в подлежащих контролю свойствах и методиках их определения: прежде всего это касается разрешающей способности методов. Это должно быть отражено в подготовке соответствующих специалистов и требованиях, предъявляемых к ним. Исходя из этого, в проект профессионального стандарта заложены следующие необходимые знания специалиста по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции:

- нормативные и регламентирующие документы (стандарты, руководства на процессы, приказы, межотраслевые документы и т.п.), обеспечивающие процесс выполнения должностных обязанностей;
- достижения отечественной и зарубежной науки и техники в области контроля качества наноструктурированной фармацевтической продукции;
- маркировка, состав, характеристики и особенности основных и вспомогательных компонентов фармацевтической продукции, в том числе содержащей наночастицы;
- технология производства наноструктурированной фармацевтической продукции;
- методы и оборудование для определения показателей качества сырья, полупродуктов и получаемой наноструктурированной фармацевтической продукции,
- применение лабораторного и промышленного оборудования для отбора и анализа проб наноструктурированной фармацевтической продукции;
- методические материалы по управлению качеством продукции;
- правила и нормы охраны труда при отборе и анализе проб сырья, полупродуктов и получаемой наноструктурированной фармацевтической продукции;
- действующая система государственной аттестации и сертификации продукции, система государственного надзора, межведомственного и ведомственного контроля за качеством продукции;
- порядок предъявления и рассмотрения рекламаций по качеству сырья, материалов, полуфабрикатов и готовой продукции.

В то же время специалист по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции должен уметь:

- разрабатывать и внедрять методы и инструкции по проведению исследований качества сырья, полупродуктов и получаемой наноструктурированной фармацевтической продукции;
- проводить входной контроль качества сырья и полупродуктов, поступающих из внешних источников и других подразделений производства;
- проводить контроль качества получаемой по используемой технологии наноструктурированной фармацевтической продукции, в том числе с применением специального оборудования для определения размеров наночастиц и их распределения по размерам;
- принимать участие в экспериментальных работах по определению стабильности наноструктурированной фармацевтической продукции в условиях хранения, транспортировки и применения;
- участвовать в работе по определению причин брака и выпуска продукции низкого качества, разрабатывать мероприятия по их предупреждению и устранению;
- совершенствовать методы исследования качества наноструктурированной фармацевтической продукции в целях повышения производительности труда, снижения трудоемкости, экономии материалов, улучшения организации рабочих мест и ликвидации брака;
- составлять годовые заявки на химические реактивы, этиловый спирт, вспомогательные материалы, контрольно-измерительное оборудование;
- проводить первичный и повторный инструктажи по охране труда и пожарной безопасности, оформлять в личной карточке инструктажа стажировку и допуск к самостоятельной работе вновь принятых рабочих;
- осуществлять контроль эксплуатации оборудования для отбора проб и лабораторного оборудования, своевременно принимать меры по устранению выявленных неисправностей и представлять его на периодическую государственную проверку;
- участвовать в работе по определению номенклатуры измеряемых параметров и оптимальных норм точности измерений, по выбору необходимых средств их выполнения, осуществлять контроль соблюдения нормативных сроков обновления наноструктурированной фармацевтической продукции и подготовки ее к аттестации и сертификации;
- организовывать проведение не предусмотренных технологическим процессом выборочных проверок качества готовой наноструктурированной фармацевтической продукции, сырья, материалов, полуфабрикатов, качества и состояния технологического оборудования, условий производства, хранения и транспортировки продукции.

В качестве классификационных уровней профессиональной подготовки использовались:

- начальник отдела контроля качества;
- заведующий контрольно-аналитической лабораторией, заведующий микробиологической лабораторией;
- химик, микробиолог;
- лаборант.

СТРУКТУРА ПРОЕКТА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА

В соответствии с проведенным анализом нормативной документации, результатов опроса и анкетирования высококвалифицированных специалистов и экспертов были определены следующие обобщенные трудовые функции.

Обобщенная трудовая функция А – «Проведение отбора проб и стандартных лабораторных исследований наноструктурированной фармацевтической продукции». Указанная функция требует квалификации уровня 4. Может осуществляться лаборантом или контролером, предполагает наличие среднего профессионального образования по программе подготовки специалистов среднего звена. Включает следующие трудовые функции.

- Отбор и транспортировка проб сырья, материалов и готовой наноструктурированной фармацевтической продукции для лабораторного анализа качества и стабильности.
- Отбор проб и пробоподготовка объектов производственной среды для микробиологического мониторинга наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Подготовка лабораторной посуды, оборудования и реактивов для анализа отобранных проб сырья, материалов, объектов производственной и технологической среды, наноструктурированной фармацевтической продукции и пробоподготовка образцов для дальнейших исследований.
- Проведение простейших анализов отобранных проб сырья, материалов, объектов производственной и технологической среды, наноструктурированной фармацевтической продукции по стандартным процедурам.
- Оформление документации лабораторного анализа сырья, материалов, объектов производственной и технологической среды, наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция B – «Исследование физико-химических показателей сырья, технологических и производственных сред, а также наноструктурированной фармацевтической продукции». Указанная функция требует квалификации уровня 5. Может осуществляться химиком или химико-аналитиком, и требует для своей реализации наличия среднего профессионального образования по программам подготовки специалистов среднего звена и не менее одного года работы по специальности в области физико-химического контроля качества фармацевтических составов. Включает в себя следующие трудовые функции.

- Проведение контроля сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции по физико-химическим показателям.
- Учет реактивов, контрольных образцов сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции для изучения стабильности и архивного хранения при контроле по физико-химическим показателям.
- Проведение и оформление валидации методик физико-химического контроля сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Квалификация и обслуживание приборов и оборудования для проведения физико-химического анализа сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Разработка и оформление документации по физико-химическому контролю качества сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция C – «Исследование микробиологических показателей сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов». Указанная функция требует квалификации уровня 5 и может осуществляться микробиологом. Для ее реализации необходимо наличие среднего профессионального образования по программе подготовки специалистов среднего звена. Включает в себя следующие трудовые функции.

- Проведение контроля сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов по микробиологическим показателям.
- Учет реактивов, питательных сред, эталонных штаммов, контрольных образцов сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции для изучения стабильности и архивного хранения при микробиологическом контроле.
- Проведение и оформление валидации методик микробиологического контроля качества сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Квалификация, обслуживание, подготовка к поверке, калибровке и аттестации приборов и оборудования для проведения микробиологического анализа сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Разработка и оформление документации по микробиологическому контролю качества сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.

Обобщенная трудовая функция D – «Управление персоналом по выполнению задач и функций в области физико-химического контроля качества наноструктурированной фармацевтической продукции». Функция требует квалификации уровня 6, так как осуществляется заведующим контрольно-аналитической лабораторией или заведующим физико-химической лабораторией, предполагает наличие высшего образования по программе бакалавриата и не менее трех лет работы по специальности на инженерно-технических должностях в области контроля качества фармацевтического сырья и продукции. Включает в себя следующие трудовые функции.

- Планирование, организация и контроль отбора и транспортировки проб для физико-химического анализа сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Планирование, организация и контроль проведения физико-химических анализов сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Планирование, организация и контроль проведения валидации аналитических физико-химических методик контроля качества сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Планирование, организация и контроль учета и хранения реактивов, сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции для изучения стабильности по физико-химическим показателям.
- Планирование, организация и контроль проведения квалификации и технического обслуживания, аттестации испытательного оборудования и поверки средств измерения для физико-химического анализа сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.
- Разработка, согласование и оформление документации по физико-химическому контролю качества сырья, материалов и наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция E – «Управление персоналом по выполнению задач и функций в области контроля микробиологической чистоты наноструктурированной фармацевтической продукции». Функция требует квалификации уровня 6 и осуществляет-

ся заведующим микробиологической лабораторией, предполагая наличие высшего образования по программе магистратуры и не менее трех лет работы по специальности на инженерно-технических должностях в области контроля качества фармацевтического сырья и продукции. Включает следующие трудовые функции.

- Планирование, организация и контроль отбора и транспортировки проб для микробиологического анализа сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Планирование, организация и контроль проведения микробиологических анализов сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Планирование, организация и контроль проведения валидации микробиологических методик контроля качества сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Планирование, организация и контроль учета и хранения реактивов, питательных сред, эталонных штаммов, стандартных образцов, контрольных образцов, архивных образцов и образцов для изучения стабильности сырья и наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов по микробиологическим показателям.
- Планирование, организация и контроль проведения квалификации и технического обслуживания, аттестации оборудования и приборов для микробиологического анализа сырья, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Разработка, согласование и оформление документации по микробиологическому контролю качества наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция F – «Организация контроля качества при промышленном производстве наноструктурированной фармацевтической продукции». Указанная функция требует квалификации уровня 7 и осуществляется начальником отдела контроля качества. Предполагает наличие высшего образования по программе магистратуры и не менее трех лет работы по специальности на инженерно-технических должностях в области контроля качества фармацевтического сырья и продукции. Включает следующие трудовые функции:

- Управление контролем качества сырья, материалов, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Одобрение или отклонение исходного сырья, материалов, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Обеспечение проведения квалификации, обслуживания оборудования и валидации методик анализа сырья, материалов, технологических и производственных сред, наноструктурированной фармацевтической продукции и упаковочных материалов.
- Разработка мероприятий по техническому перевооружению, реконструкции лабораторий контроля качества наноструктурированной фармацевтической продукции.

Разработчиками квалификационных требований к проекту профессионального стандарта «Специалист по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции» проведен анализ нормативных, методических и других документов, регулирующих инженерные виды трудовой деятельности в области разработки и производства наноструктурированной фармацевтической продукции. Результаты различных обсуждений протоколировались и использовались экспертной группой для окончательной доработки проекта профессионального стандарта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разрабатываемый профессиональный стандарт «Специалист по контролю и проведению испытаний качества наноструктурированной фармацевтической продукции» должен установить необходимые трудовые функции и нормативные требования к уровню квалификации работника, которые позволят работодателю обоснованно подбирать кадры для выпуска наноструктурированной фармацевтической продукции, а работника мотивируют на достижение уровня компетенции, который позволит ему продвигаться по карьерной лестнице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минпромторга РФ от 23.10.2009 № 965 «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года».
2. Приказ Минтруда России от 12.04.2013 № 147н (ред. от 29.09.2014) «Об утверждении макета профессионального стандарта» (зарегистрировано в Минюсте России 24.05.2013 № 28489).
3. Приказ Минтруда России от 29.09.2014 № 665н «О внесении изменений в макет профессионального стандарта, утвержденный приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 12 апреля 2013 года № 147н».
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 22.01.2013 № 23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов».
5. Приказ Минтруда России 29.04.2013 № 170н «Об утверждении методических рекомендаций по разработке профессиональных стандартов».



УПАКОВКА ВСЕХ ТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Крупнейший национальный дистрибьютор технологического оборудования в России ГК «Фармконтракт» представляет широкий спектр решений для упаковки жидких, мягких и твердых лекарственных форм на базе европейских и корейских производителей фасовочно-упаковочного оборудования:

ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА





Розлив продуктов в банки и флаконы с последующей укупоркой и закруткой



Фасовка вязких продуктов в пластиковые и алюминиевые тубы, производительность до 8 000 туб в час



Фасовка порошков и гранул в саше



Розлив до 200 контейнеров в минуту в виалы, шприцы и картриджи с последующей укупоркой

ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА

Фасовка в коробки



Групповая упаковка



Решения по упаковке готовых лекарственных форм от ГК «Фармконтракт» - **100% гермитичность, а значит, гарантия качества и сохранности лекарственных средств даже в самых экстремальных условиях транспортировки!**

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 661.12; 66-5; 66-7; 331.103.11

РАЗРАБОТКА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ПОДГОТОВКЕ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Д.О. Шаталов[1,3]*, С.А. Кедик[1,3], А.Н. Бабиков[2], И.В. Стерин[1]

Резюме. В данной работе описан проект разрабатываемого профессионального стандарта «Специалист по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции». Приведены структура проекта профессионального стандарта, а также описание трудовых функций и компетенции соответствующих специалистов. Обозначена необходимость разработки данного стандарта как для подготовки специалистов, так и для работодателей.

Ключевые слова: профессиональный стандарт, уровень квалификации, обобщенная трудовая функция, трудовая функция, наноструктурированная продукция, фармацевтическая продукция, эксплуатация оборудования.

DEVELOPMENT OF PROFESSIONAL STANDARD FOR SPECIALISTS ON PREPARATION AND OPERATION OF EQUIPMENT FOR MANUFACTURING NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

D.O. Shatalov[1,3]*, S.A. Kedik[1,3], A.N. Babikov[2], I.V. Sterin[1]

Abstract. This work reflects the description of the developed professional standard «Specialist in the preparation and operation of equipment for the production of nanostructured pharmaceuticals». Formulations of the generalized labor functions are resulted, the benefit of development of the given standard, both in relation to experts, and in relation to employers is shown.

Keywords: professional standard, qualification level, general labor function, labor function, nanostructured products, pharmaceuticals, equipment operation.

1 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

2 – НПФ «Материа Медика Холдинг», 129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1

3 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) Министерства образования и науки Российской Федерации, 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

1 – CJSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Materia Medica Holding, 47/1, Trifonovskay str., Moscow, 129272, Russia

3 – Moscow Technological University (MITHT), Ministry of education and science of the Russian Federation, 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: shat-05@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время происходит бурное развитие фармацевтической отрасли в России, подразумевающее повышение конкурентоспособности отечественной фармацевтической промышленности путем гармонизации российских стандартов по разработке и производству лекарственных средств с международными требованиями, технологическое перевооружение российской фармацевтической отрасли и совершенствование системы подтверждения соответствия качества лекарственных средств. Большой интерес при этом вызывают новые субстанции и фармацевтические препараты с улучшенной эффективностью, а также инновационные продукты. К числу таких продуктов относятся биологические активные системы терапевтического назначения, один из компонентов которых представлен в форме наночастиц (не более 100 нм). Разработка состава и технологии получения, поддержание стабильности и контроль качества таких систем требуют высокой квалификации соответствующих специалистов, а процесс производства наноструктурированных фармацевтических систем подразумевает использование специфического оборудования. В качестве примера такого оборудования можно привести микрореакторные установки (микрофлюидные технологии), развитие которых в настоящее время претерпевает бурный рост. Эксплуатация и обслуживание этих и других наноструктурирующих установок представляет собой определенную техническую сложность, поэтому разработка

профессионального стандарта «Специалист по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции» является актуальной проблемой.

Таким образом, ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) совместно с научно-производственной фирмой «Материа Медика Холдинг», общероссийским объединением работодателей «Российский союз промышленников и предпринимателей», ООО «НАНОЛЕК», ООО «Изварино Фарма», ООО «Нанофарма Девелопмент», ОАО «Татхимфармпрепараты», а также ЗАО «Институт фармацевтических технологий» разрабатывают проект профессионального стандарта «Специалист по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции». При формировании учитывается практический стаж разработчиков стандарта в области производства фармацевтической продукции, а также наличие их квалификационных категорий.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ ПРОЕКТА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА

Этапы разработки проекта профессионального стандарта соответствуют положениям, определенным приказом Минтруда России № 170н «Об утверждении методических рекомендаций по разработке профессиональных стандартов» [1], а также постановлением Правительства Российской Федерации № 23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов» [2]. Структура проекта профессионального стандарта соответствует требованиям макета профессионального стандарта, утвержденного приказом Минтруда России № 147н [3], и изменениям, внесенным в этот макет, утвержденным приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации № 665н [4].

Одной из задач, стоящих перед работниками вышеуказанной области, является обеспечение бесперебойной работы оборудования на стабильных технологических режимах для производства наноструктурированной фармацевтической продукции. Примерами подобного оборудования могут служить:

- установки для мембранного и микроситового эмульгирования;
- микрореакторные системы различного типа;
- установки псевдоожиженного слоя и распылительной сушки;
- фармацевтические смесители, в том числе наноструктурирующие;
- таблеточные прессы, не нарушающие стабильность нанопродукции;
- обеспыливатели таблеток, не нарушающие стабильность нанопродукции.

СТРУКТУРА ПРОЕКТА ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА

Специалисты, обеспечивающие подготовку и эксплуатацию оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции, помимо знаний и квалификаций, необходимых для стандартного фармацевтического производства, должны проходить подготовку на базе определенных сводов правил, в том числе правил GMP (Good Manufacturing Practice), а также стандартов ISO, относящихся к наноструктурированной продукции. Специфика наноструктурирующего производственного оборудования и высокий уровень подготовки специалистов по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции отражены в стандарте в виде обобщенных трудовых функций, которые включают в себя частные трудовые функции. Последние, в свою очередь, объединяют необходимые трудовые действия, умения и знания. Приведенные в стандарте обобщенные трудовые функции представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Обобщенные трудовые функции специалиста по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции

Код	Наименование	Уровень квалификации
A	Проведение технического обслуживания и ремонта технологического оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции	4
B	Контроль обеспечения поддержания бесперебойной работы технологического и вспомогательного оборудования на стабильных технологических режимах производства наноструктурированной фармацевтической продукции	5
C	Организация деятельности по осуществлению инженерного сопровождения производства наноструктурированной фармацевтической продукции	6
D	Руководство процессом инженерного сопровождения производства наноструктурированной фармацевтической продукции	7

Осуществление обобщенной трудовой функции, относящейся к коду А, подразумевает получение специалистом среднего профессионального образования – программы подготовки специалистов среднего звена (в данном случае механика) и объединяет в себе следующие трудовые функции:

– проведение плановых осмотров оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– проведение планового технического обслуживания оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– осуществление ремонта технологического оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции.

Выполнение обобщенной трудовой функции, относящейся к коду B, осуществляется инженером или инженером-механиком и подразумевает получение специалистом высшего образования – уровня бакалавриата. Данная обобщенная трудовая функция объединяет в себе следующие трудовые функции:

– обеспечение и контроль проведения плановых осмотров, планового технического обслуживания и ремонтов;

– руководство процессом монтажа (демонтажа) инженерных систем и оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– разработка и ведение внутренней технической документации по эксплуатации оборудования и инженерных систем;

– контроль и управление параметрами штатного режима работы оборудования и инженерных систем;

– планирование и контроль выполнения корректирующих и предупреждающих действий;

– проведение обучения и аттестации персонала, оформление сопутствующей документации;

– метрологическое сопровождение производства наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция кода C осуществляется заместителем начальника отдела или начальником участка, который обязан иметь высшее образование – уровень бакалавриата или специалитета, а также иметь опыт работы не менее двух лет по специальности на должностях специалистов среднего звена по производству фармацевтической продукции. Данная обобщенная трудовая функция объединяет в себе такие трудовые функции, как:

– разработка и организация выполнения планов технического обслуживания и ремонта инженерных систем и оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– согласование внутренней технической документации по эксплуатации оборудования и инженерных систем;

– организация поддержания технических параметров оборудования в регламентированных пределах;

– контроль метрологического обеспечения оборудования и инженерных систем.

Обобщенная трудовая функция кода D осуществляется начальником отдела или главным механиком, которые обязаны иметь высшее образование – уровень специалитета или магистратуры, а также иметь опыт работы не менее пяти лет по специальности на инженерно-технических должностях по профилю деятельности. Данная обобщенная трудовая функция объединяет в себе следующие трудовые функции:

– руководство разработкой нормативных материалов по инженерному сопровождению производства;

– проведение модернизации производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– утверждение планов инженерного сопровождения процессов производства;

– проведение комплексного анализа деятельности подразделения;

– обеспечение проведения квалификации инженерных систем и оборудования производства наноструктурированной фармацевтической продукции;

– участие в подготовке производственной площадки к проведению мероприятий по лицензированию, инспектированию и аудитам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перечисленные выше обобщенные трудовые функции позволяют создать исчерпывающий набор требований к специалистам по подготовке и эксплуатации оборудования для производства наноструктурированной фармацевтической продукции. Следует отметить, что разрабатываемый проект профессионального стандарта является более широким, чем был бы его аналог для фармацевтической продукции, не содержащей наноструктур. При разработке проекта стандарта учтены современные тенденции в развитии производства наноструктурированной продукции, что позволяет подготовить квалифицированных специалистов в новой области фармацевтического производства. Кроме того, наличие разработанного документа четко обозначает уровень требований работодателей к будущим работникам, что способствует качественному развитию фармацевтической отрасли в области производства наноструктурированной фармацевтической продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минтруда России от 29 апреля 2013 г. № 170н «Об утверждении методических рекомендаций по разработке профессиональных стандартов».
2. Постановление Правительства Российской Федерации от 22 января 2013 г. № 23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов»
3. Приказ Минтруда России от 12.04.2013 № 147н «Об утверждении макета профессионального стандарта» (редакция от 29.09.2014).
4. Приказ Минтруда России от 29 сентября 2014 г. № 665н «О внесении изменений в макет профессионального стандарта, утвержденный приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 12 апреля 2013 года № 147н».



BAUSCH
Advanced Technology Group

СИСТЕМА ДЛЯ РОЗЛИВА И УКУПОРКИ
Machine Type 535

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



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

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 661.12.01/9; 331.103.11

ФОРМИРОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К СПЕЦИАЛИСТУ-ИССЛЕДОВАТЕЛЮ ПО РАЗРАБОТКЕ РЕЦЕПТУРЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

С.А. Кедик[1,3], А.Н. Бабиков[2], Е.С. Жаворонок[1,3]*, А.М. Твердохлебова[3]

Резюме. В работе рассмотрены основные подходы к формированию требований к специалисту-исследователю в области разработки новых составов наноструктурированной фармацевтической продукции. Приведена структура проекта профессионального стандарта «Специалист-исследователь по разработке рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции», а также описание трудовых функций и компетенции соответствующих специалистов.

Ключевые слова: профессиональный стандарт, уровень квалификации, обобщенная трудовая функция, трудовая функция, наноструктурированная продукция, фармацевтическая продукция, разработка рецептуры.

FORMATION OF REQUIREMENTS TO SPECIALIST-EXPLORER IN DEVELOPMENT OF RECEIPT OF NANOSTRUCTURED PHARMACEUTICALS

S.A. Kedik[1,3], A.N. Babikov[2], E.S. Zhavoronok[1,3]*, A.M. Tverdokhlebova[3]

Abstract. The article is devoted to main approaches to the requirements formation to specialist- researcher in the field of nanostructured pharmaceuticals. The structure of the Professional Standard Project «Specialist-researcher for the development of the nanostructured pharmaceuticals formulation» is described, as well as the description of the labor functions and competences of the specialists.

Keywords: professional standard, qualification level, general labor function, labor function, nanostructured products, pharmaceutical products, formulation development.

1 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

2 – НПФ «Материа Медика Холдинг», 129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1

3 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) Министерства образования и науки Российской Федерации, 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

1 – CJSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Materia Medica Holding, 47/1, Trifonovskay str., Moscow, 129272, Russia

3 – Moscow Technological University (MITHT), Ministry of education and science of the Russian Federation, 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время остро стоит вопрос о подготовке новых кадров, способных быстро и успешно войти в производственный процесс, способствуя улучшению качества получаемой продукции. Поэтому в соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 22 января 2013 года № 23 «О правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов» в настоящее время в нашей стране предприятия, общественные и образовательные организации ведут совместную активную работу по созданию и обсуждению новых профессиональных стандартов [1]. Одним из перспективных направлений разработки новых профессиональных стандартов, согласно Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года (утверждена приказом Минпромторга РФ от 23.10.2009 № 965) [2], является фармация. Однако в настоящее время в России ощущается нехватка профессиональных кадров для современного фармацевтического производства и индустриальной науки, а также их недостаточная подготовка. Одним из способов повышения уровня квалификации работников является создание требований к специалистам-исследователям по разработке рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции. Таким образом, разработка профессионального стандарта «Специалист-исследователь по разработке рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции» является актуальной. На основе та-

кого стандарта специалист-разработчик наноструктурированных рецептур фармацевтических продуктов может повышать свою квалификацию и профессиональные навыки, а работодатель – обоснованно формулировать требования к профессиям в отдельной области. На основании такого стандарта возможна разработка соответствующих программ обучения и методических материалов.

Учитывая эти обстоятельства, НПФ «Материа Медика Холдинг» совместно с ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ) и ЗАО «Институт фармацевтических технологий» по поручению Фонда инфраструктурных и образовательных программ («РОСНАНО») разрабатывают профессиональный стандарт по подготовке специалистов-исследователей по разработке рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции. Структура разрабатываемых проектов соответствует требованиям макета профессионального стандарта, учреждённого приказом Минтруда России № 147н «Об учреждении макета профессионального стандарта» от 12 апреля 2013 г. [3] и приказом Минтруда России № 665н «О внесении изменений в макет профессионального стандарта, учреждённого приказом Минтруда России от 12 апреля 2013 г. № 147н» от 29 сентября 2014 г. [4].

ПРОЕКТ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА ПО РАЗРАБОТКЕ РЕЦЕПТУРЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Разработчиками проекта профессионального стандарта «Специалист-исследователь по разработке рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции» были проанализированы и систематизированы документы базовых организаций, необходимые для осуществления процесса разработки рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции:

- отраслевые/ведомственные и корпоративные инструкции (в том числе определяющее должностные/функциональные обязанности работников), квалификационные характеристики, описания рабочих мест;
- отраслевые/ведомственные и корпоративные нормативные акты (приказы, постановления, распоряжения), содержащие сведения о номенклатуре видов профессиональной деятельности / профессий, об определении уровня квалификации при присвоении разрядов / квалификационных категорий / классов и т.п.;
- технологические карты, относящиеся к данному виду профессиональной деятельности;
- техническая документация на лабораторное и промышленное оборудование.

В соответствии с проведенным анализом нормативной документации, результатов опроса и анкетирования высококвалифицированных специалистов и экспертов были определены следующие обобщенные трудовые функции.

Обобщенная трудовая функция А – «Стандартные лабораторные и опытно-промышленные исследования наноструктурированной фармацевтической продукции». Указанная функция подразумевает 4 уровень квалификации и может осуществляться лаборантом, лаборантом-техником, лаборантом физико-химических исследований и лаборантом-исследователем. Она предполагает наличие среднего профессионального образования по программе подготовки специалистов среднего звена и включает следующие трудовые функции:

- проведение лабораторных испытаний сырья и экспериментальных составов наноструктурированной фармацевтической продукции на его основе по стандартным методикам;
- изготовление экспериментальных составов полупродуктов и готовых лекарственных форм наноструктурированной фармацевтической продукции по заданным рецептурам;
- наработка в лабораторных условиях на основе выбранной рецептуры и технологии укрупненных серий лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции;
- испытания укрупненных серий наноструктурированной фармацевтической продукции в лаборатории по стандартным методикам;
- обработка результатов лабораторных испытаний сырья и экспериментальных составов наноструктурированной фармацевтической продукции с помощью стандартных математических и статистических приемов и методик.

Обобщенная трудовая функция В – «Фармацевтическая разработка состава и технологии наноструктурированной фармацевтической продукции». Ей соответствует 5 уровень квалификации и должность специалиста в качестве инженера-химика или инженера-технолога, также предусматривающая среднее профессиональное образование по программам подготовки специалистов среднего звена. К этой категории относятся следующие трудовые функции:

- разработка стратегии экспериментальных исследований по результатам поиска и анализа научно-технической литературы о наноструктурированной фармацевтической продукции;
- выбор сырья и материалов для изготовления наноструктурированной фармацевтической продукции в соответствии с ее назначением;
- выбор технологии и оборудования для изготовления экспериментальных составов полупродуктов и готовой лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции;
- выбор методологии и проведение лабораторных испытаний экспериментальных составов полупродуктов и готовой лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции;
- проведение валидации технологического процесса и методик контроля качества наноструктурированной фармацевтической продукции;
- заключение о технической возможности и целесообразности выпуска опытной партии новой наноструктурированной фармацевтической продукции на основании анализа научно-технической литературы.

Обобщенная трудовая функция C – «Руководство разработкой оптимальной рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции и выпуском опытной партии по ней». Выполнение этой трудовой функции производится химиком-исследователем или инженером-технологом производственного участка, имеющим 6 уровень квалификации. Это подразумевает наличие высшего образования (бакалавр) и не менее трех лет работы по специальности в области разработки рецептур фармацевтических составов. Включает в себя:

- составление технического задания на закупку, проектирование и изготовление комплектующих и оснастки для производства новой наноструктурированной фармацевтической продукции;
- выбор оптимальной рецептуры готовой лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции;
- производство опытно-промышленной серии готовой лекарственной формы на основе оптимальной рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции;
- проведение аналитических и технологических испытаний опытной партии готовой лекарственной формы на основе оптимальной рецептуры наноструктурированной фармацевтической продукции и заключение о технической возможности промышленного производства;
- подготовка документации по наработке опытно-промышленной серии готовой лекарственной формы.

Обобщенная трудовая функция D – «Руководство биологическими испытаниями сырья и готовой лекарственной формы разработанной наноструктурированной фармацевтической продукции».

Выполнение этой трудовой функции производится биологом-исследователем или микробиологом, имеющим 6 уровень квалификации. Это подразумевает наличие высшего образования (бакалавр) и не менее трех лет работы по специальности на должности в области биологических исследований фармацевтических составов. Включает в себя следующие трудовые функции:

- выбор способов обеспечения микробиологической чистоты опытной партии готовой лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции;
- выбор методик и проведение лабораторных микробиологических испытаний полупродуктов и опытной партии наноструктурированной фармацевтической продукции;
- контроль за проведением лабораторных биологических (доклинических) испытаний опытной партии сертифицированной сторонней организацией;
- оформление результатов исследований и заключение о качестве опытной партии наноструктурированной фармацевтической продукции.

Обобщенная трудовая функция E – «Организация разработки рецептуры нового наноструктурированного фармацевтического состава и его лекарственной формы в соответствии с техническим заданием». Она характеризуется 7 уровнем квалификации и выполняется начальником исследовательской лаборатории, заведующим лабораторией исследований и разработок, руководителем центра исследований и разработок или начальником лаборатории научных исследований, имеющим высшее образование (магистратура) и опыт работы не менее пяти лет в области разработки фармацевтической продукции. В рамках этой обобщенной трудовой функции выполняются следующие функции:

- определение базовых направлений в области разработки наноструктурированной фармацевтической продукции и организация разработки технического задания на создание новой рецептуры целевого назначения;
- организация поиска научно-технической и логистико-экономической информации о существующей наноструктурированной фармацевти-

ческой продукции и доступном сырье для ее производства;

- организация получения и исследования экспериментальных составов, выбора оптимальной рецептуры и технологии изготовления наноструктурированной фармацевтической продукции;
- организация выпуска опытной серии наноструктурированной фармацевтической продукции по разработанной оптимальной рецептуре и заключение о технической возможности промышленного производства;
- проверка и согласование документации по разработке технологии получения готовой лекарственной формы наноструктурированной фармацевтической продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все пять обобщенных трудовых функции в совокупности полностью охватывают и исчерпывают задачи специалиста в области разработки составов наноструктурированной фармацевтический продукции. Ожидается, что внедрение рассматриваемого стандарта в область разработки и производства наноструктурированной продукции позволит разработать квалификационные требования для данной профессиональной области, получить объективную оценку квалификационного уровня работника при включении его в кадровый резерв, а также сформировать и проводить подготовку внешнего кадрового резерва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 22 января 2013 г. № 23 «О Правилах разработки, утверждения и применения профессиональных стандартов».
2. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года (утв. приказом Минпромторга РФ от 23.10.2009 № 965).
3. Приказ Минтруда России от 12.04.2013 № 147н «Об утверждении макета профессионального стандарта» (редакция от 29.09.2014).
4. Приказ Минтруда России от 29 сентября 2014 г. № 665н «О внесении изменений в макет профессионального стандарта, утвержденный приказом Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации от 12 апреля 2013 года № 147н».



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

УДК 543; 615.214; 547.743.1

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТЫ АМИНОКАПРОНОВОЙ В МНОГОКОМПОНЕНТНОМ ГЕМОСТАТИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

Ю.Н. Барсукова[1]*, О.А. Мельникова[1], М.Ю. Мельников[1]

Резюме. В статье описана методика количественного определения аминокапроновой кислоты в многокомпонентном гемостатическом лекарственном средстве местного действия. В качестве метода анализа выбрана прямая спектрофотометрия при длине волны 568 нм. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, приведенным в ОФС ГФ XIII изд. «Валидация аналитических методик». Аналитическая область методики составила 0,04–0,06 г/мл. Методика может быть воспроизведена в лабораторных условиях с доверительной вероятностью P=95%, правильность измерения составила 1,36%.

Ключевые слова: гемостатическое средство, количественное определение, аминокапроновая кислота, спектрофотометрия.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUES OF DETERMINATION OF AMINOCAPROIC ACID IN A MULTI-COMPONENT HEMOSTATIC AGENT

Yu.N. Barsukova[1]*, O.A. Melnikova[1], M.Yu. Melnikov[1]

Abstract. The article describes a method for quantitative determination of aminocaproic acid in a multi-component hemostatic medical agent having the local effect. The analysis uses the method of direct spectrophotometry with the wavelength of 568 nm. Based on the results of the study, the main validation characteristics of the method meet the eligibility criteria according to the general pharmaceutical article «Validation of analytical methods» from the XIII edition of the State Pharmacopoeia. The analytical area of the procedure was 0.04–0.06 g/ml. The technique can be reproduced in laboratories with the confidence level P=95%, the correctness of the measurement was 1.36%.

Keywords: hemostatic agents, quantitative determination, aminocaproic acid, spectrophotometry.

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

1 – Urals State University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Repin str., Yekaterbutg, 620028, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: iulija.barsukowa@yandex.ru, newfarmacia@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Гемостатические средства местного действия предназначены для остановки наружного кровотечения различной степени интенсивности. На сегодняшний день на фармацевтическом рынке представлена широкая номенклатура гемостатических лекарственных препаратов. Имеются как монокомпонентные (неорганические соли, коллагеновая и желатиновая губки, препараты на основе окисленной регенерированной целлюлозы, цианакрилатные гели и др.), так и поликомпонентные лекарственные формы («Алюстат», «CoStasis», «Тромбоксол», «Тахокомб», «Оксицелодекс», «Капрофер» и др.) [1].

Идеальный гемостатический препарат должен быть безопасным, эффективным, практичным, доступным, а также обладать простотой хранения, удобством использования и применения [2]. В связи с этим поиск более безопасных и эффективных гемостатических средств сохраняет свою актуальность. Это обусловливает важность создания новых препаратов и композиций, обладающих местным гемостатическим действием.

К сожалению, несмотря на разнообразие гемостатических средств, ни одно из них не обладает оптимальными свойствами при местном применении, поскольку существуют в лекарственных формах для парентерального введения (раствор аминокапроновой кислоты, амбен, апротекс, памба, транексам и другие). Среди изделий медицинского назначения важное значение играет гемостатическая губка, но и её свойства не оптимальны, поскольку она требует тампонации и

плотного прилегания к ране. Следовательно, важной задачей является разработка многокомпонентных гемостатических композиций. Достоинством таких композиций является комплексность свойств, которая не может быть достигнута в случае индивидуального применения лекарственных препаратов. Однако, с другой стороны, изучение свойств многокомпонентных композиций представляет собой определенную сложность. Наиболее сложным моментом является изучение их стабильности и количественного содержания ингредиентов смеси.

В связи с этим целью данного исследования является разработка и валидация методики количественного определения аминокапроновой кислоты в многокомпонентной лекарственной форме.

В рамках поставленной задачи нами был разработан состав гемостатического средства, включающий хлорид железа (III), аминокапроновую кислоту и натрия хлорид.

ε – аминокапроновая кислота, является синтетическим аналогом лизина. Ингибирует фибринолиз, конкурентно насыщая лизинсвязывающие рецепторы, благодаря которым плазминоген (плазмин) связывается с фибриногеном (фибрином). Кроме этого, уменьшает проницаемость капилляров, тормозит активирующее действие стрептокиназы и урокиназы на фибринолиз [3].

В качестве метода количественного определения аминокапроновой кислоты в гемостатическом средстве была выбрана прямая спектрофотометрия. Данный метод находит широкое применение в фармацевтическом анализе как для идентификации и определения примесей, так и для количественного определения лекарственных средств. Основными достоинствами являются: относительная простота эксперимента, быстрота, специфичность определяемого вещества [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является гемостатическое средство следующего состава (таблица 1):

Таблица 1.

Состав гемостатического средства

Ингредиент	Нормативная документация	Масса, г
Кислота аминокапроновая	ФС.2.1.0001.15, ГФ XIII изд.	5,0 *
Железа III хлорид	ТУ 2152-003-68879995-2014	2,0
Натрия хлорид	ФС.2.2.0014.15, ГФ XIII изд.	0,9
Вода очищенная	ФС.2.2.0020.15, ГФ XIII изд.	92,1

Примечание: * – концентрация кислоты аминокапроновой в растворе 0,05 г/мл.

Оборудование: спектрофотометр СФ-2000 («Биокей», Россия), абсолютная погрешность установки длины волны составляет ±0,8 нм; весы аналитические CE224-C («Сартогосм», Россия), ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность однократного взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,5 мг.

Реактивы

Хлорид железа III 6-вод. (х.ч., ОАО «Бром», Россия), ГОСТ 4147-74.

Кислота аминокапроновая (ООО «Полисинтез», Россия), ГОСТ 7850-2013.

Натрия хлорид (АО «Усолье-Сибирский химико-фармацевтический завод», Россия), ФС- 001536.

Этанол 95% (ООО «Гиппократ», Россия), ФС-000737.

Нингидрин (х.ч., ООО «Югреактив», Россия), с массовой долей основного вещества не менее 95%.

Кислота аскорбиновая (х.ч., ООО «Полисинтез», Россия), Р N002030/01.

Натрий фосфорно-кислый двузамещённый 12-водный (ООО «Хим», Россия), ГОСТ 4172-76.

Калий фосфорно-кислый однозамещённый (ООО «Югреактив», Россия), ГОСТ 4198-75.

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

Посуда: колба плоскодонная мерная с цилиндрической горловиной 100 и 250 $см^3$ (ГОСТ 29044-91), цилиндры мерные 10 $см^3$ (ГОСТ 1770-74), пипетка градуированная 5 и 2 $см^3$ (ГОСТ 29227-91).

Пробоподготовка. Фосфатный буферный раствор pH 6,4.

1,79 г динатрия гидрофосфата, 1,36 г калия дигидрофосфата и 7,02 г натрия хлорида растворяют в воде и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл. Если необходимо, доводят pH до 6,4 потенциометрически с помощью 1 М раствора натрия гидроксида или 1 М раствора хлористоводородной кислоты [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В основе количественного определения аминокапроновой кислоты лежит нингидриновая проба, в результате которой образуется продукт сине-фиолетового цвета. Схема данной реакции представлена на рисунке 1.

При разработке методики учитывались такие параметры, как объем аликвоты, pH среды, длина волны. На первом этапе определяли область pH раствора, где наблюдается максимальное поглощение гемостатического средства:

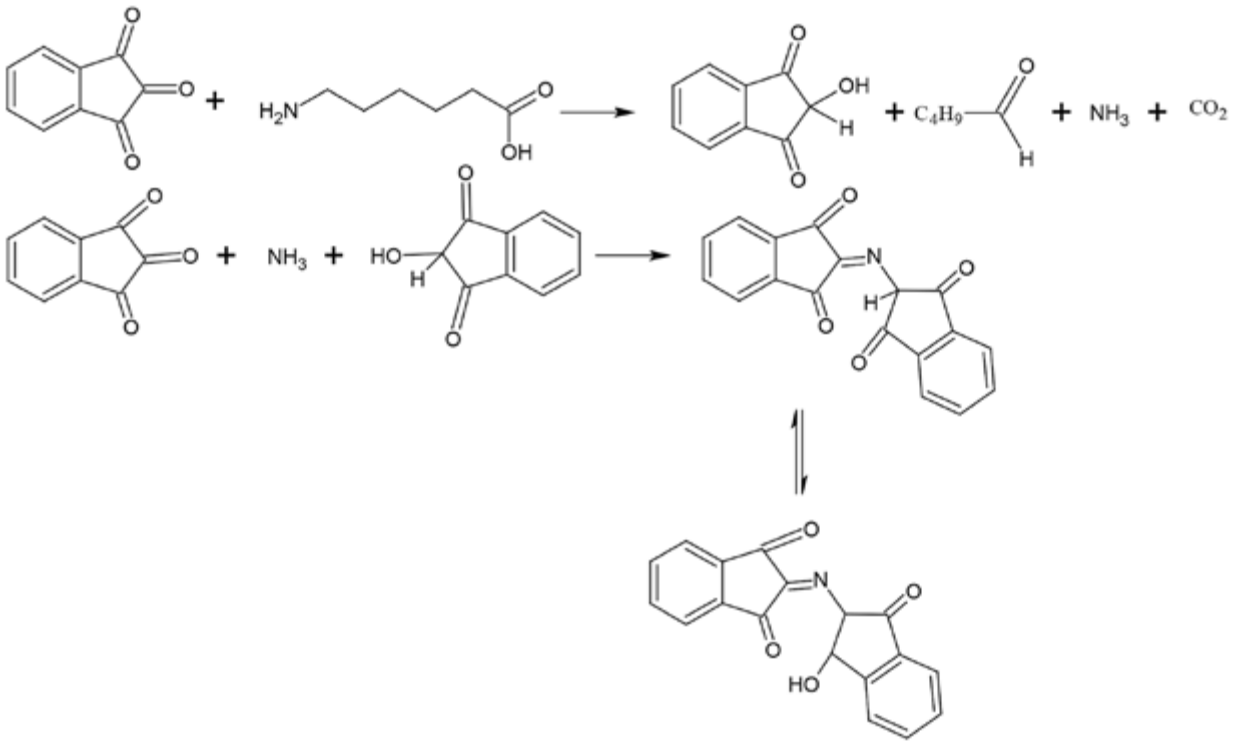


Рисунок 1. **Схема протекания нингидриновой пробы**

1) Выбор оптимального значения pH гемостатического средства.

Характер спектров поглощения зависит от pH среды растворов. Особое влияние оказывает pH среды на электронные переходы π→π*, так как происходит протонизация ионизированных групп. Поэтому изучение спектральных характеристик кислоты аминокапроновой в УФ-области проводили при различных значениях pH среды с целью получения ионизированной и молекулярной форм исследуемого вещества [6].

Для создания pH среды использовали фосфатные буферные растворы со следующими значениями pH среды: 6,2; 6,4; 6,8 и 7,2.

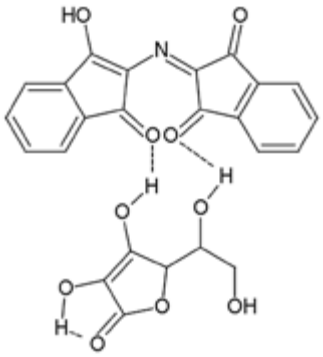
2) Приготовление испытуемого раствора.

Аликвоту (1 мл) гемостатического средства помещают в мерные колбы вместимостью 250 мл, доводят водой до метки, перемешивают (раствор А).

В четыре мерные колбы на 100 мл помещают по 3 мл раствора А, в каждую добавляют 4 мл фосфатного буферного раствора с pH 6,2; 6,4; 6,8 и 7,2 соответственно, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 95%, 2 мл 0,05% водного раствора аскорбиновой кислоты.

Введение аскорбиновой кислоты (нормальный окислительно-восстановительный потенциал +0,167 В) в реакционную массу не изменяет характера спектра поглощения продукта реакции амин – нингидрин, но значительно увеличивает интенсивность поглощения [7].

Предполагаемая структура образовавшегося комплекса:



Содержимое колб нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили водой до метки и перемешивали (испытуемый раствор).

Ультрафиолетовые спектры поглощения изучали с помощью отечественного спектрофотометра СФ-2000 в пределе длин волн 190–700 нм. У полученных растворов измеряют оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

3) Приготовление раствора сравнения.

В четыре мерные колбы вместимостью 100 мл помещают 2 мл воды, 4 мл фосфатного буферного раствора с разным значением pH, 2 мл 1% раствора нингид-

рина в спирте этиловом 95%, 2 мл 0,05% водного раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое колб нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают. Далее измеряют оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

4) Приготовление раствора стандартного образца.

Около 0,0500 г (точная навеска) субстанции Аминокапроновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем колбы тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор В). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3 мл раствора В и далее поступают, как указано в основной методике.

В результате построен график зависимости оптической плотности от pH среды (рисунок 2). Максимальное поглощение ε-аминокапроновой кислоты наблюдается при pH 6,4.

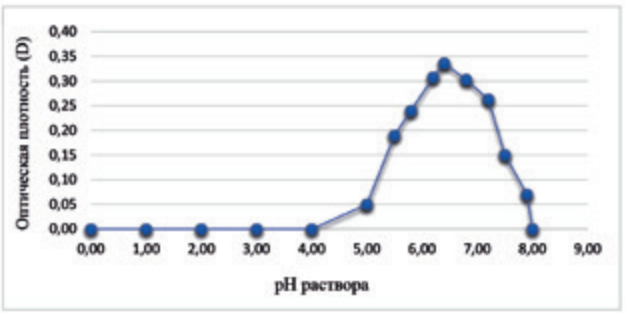


Рисунок 2. Изменение оптической плотности в зависимости от pH раствора

В результате выбраны следующие параметры методики: аналитическая длина волны – 568 нм. Среда – фосфатный буферный раствор с pH 6,4.

Содержание аминокапроновой кислоты $C_6H_{13}NO_2$(X) в 1 мл гемостатического препарата вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_{лп} \times V \times a_{ст} \times 3}{A_{ст} \times a_{лп} \times 3 \times 250 \times 100} = \frac{A_{лп} \times a_{ст}}{A_{ст} \times a_{лп}},$$

где $A_{лп}$ – оптическая плотность гемостатического средства; $A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца аминокапроновой кислоты; $a_{лп}$ – навеска гемостатического средства, мл; $a_{ст}$ – навеска стандартного образца, г; V – объем мерной колбы для приготовления разведения препарата, мл (250).

Полученные спектры стандартного образца и гемостатического средства представлены на рисунке 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в результате спектрофотометрического определения кислоты аминокапроновой данные и их статистическая обработка с использованием Microsoft Excel представлены в таблице 2.

Расчет валидационных характеристик методики

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об объекте анализа и пригодна для практического использования. Валидацию методики спектрофотометрического определения кислоты аминокапроновой с использованием нингидриновой пробы в гемостатическом средстве проводили по таким характеристикам, как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность [8].

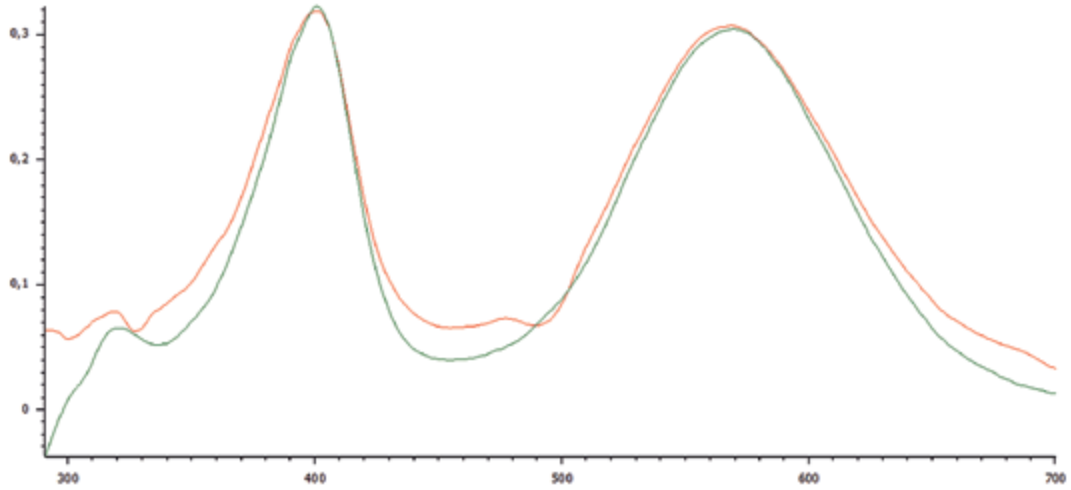


Рисунок 3. Спектр гемостатического средства и стандартного образца (СО)

Примечание: красным цветом изображен спектр СО, зеленым – раствора гемостатического средства (концентрация аминокапроновой кислоты – 50 мг/мл)

Таблица 2.

Метрологическая характеристика метода анализа (P=95%; n=6)

№	A_x	$A_{ст}$	$a_{ст}$	X, г/мл	$X_{ср}$, г/мл	ΔX	ε,%	$x_{абс.}$	$X_{ср}$±ΔX,г/мл
1	0,3251	0,3072	0,0492	0,0521	0,0522	0,0007	1,36	0,05	0,0522±0.0007
2	0,3251	0,3171	0,0502	0,0515					
3	0,3251	0,3169	0,0510	0,0523					
4	0,3250	0,3073	0,0502	0,0531					
5	0,3251	0,3069	0,0498	0,0527					
6	0,3251	0,3171	0,0501	0,0517					

Примечание: Полученный результат X=0,0522±0,0007, г/мл.

1. Специфичность методики

Специфичность аналитической методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат. Для определения данного показателя необходимо приготовить ряд модельных смесей. Для установления специфичности методики требуется проанализировать модельные смеси по следующей схеме.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 мл модельной смеси, 4 мл фосфатного буферного раствора с pH 6,4, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 95%, 2 мл 0,05% водного раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое колбы нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают. Далее измеряют оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

Состав модельных смесей и результаты представлены в таблице 3.

Заключение по показателю «специфичность»: полученные результаты соответствует требованию валидации по показателю «специфичность» спектрофотометрического определения аминокапроновой кислоты, так как модельные смеси № 1, 2, 3, 4 не поглощают свет при длине волны 568 нм, а модельная смесь № 5 поглощает.

2. Линейность и аналитический область методики

Линейность методики – это наличие прямой пропорциональной зависимости оптической плотности от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе.

Линейность выражается уравнением ***y=ax+b***. Это уравнение называют линейной регрессией. Параметр ***b*** градуировочной функции характеризует отрезок, отсекаемый на оси ординат и соответствующий значению холостого опыта, а коэффициент ***a*** характеризует наклон градуировочной кривой и является отражением чувствительности методики

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением результата анализа и характеризуются приемлемым уровнем правильности и промежуточной прецизионности. В общем случае при количественном анализе диапазон составляет 80–120% от номинального значения концентрации компонента. Аналитическая область методики устанавливалась по диапазону экспериментальных данных удовлетворяющей линейной модели.

Для проверки линейности следует брать не менее 5 экспериментальных точек. При этом наиболее правильно использовать отдельные навески и затем готовить из них растворы соответствующих концентраций.

Таблица 3.

Состав модельных смесей для показателя «специфичность методики»

№	Состав модельной смеси	Оптическая плотность							
		A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	$A_{ср}$
1.	Вода (Растворитель)	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000
2.	2% водный раствор железа III хлорида	0,001	0,002	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002
3.	0,9% водный раствор натрия хлорида	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002
4.	Смесь 2+3	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,004
5.	5% водный раствор кислоты аминокапроновой	0,403	0,409	0,406	0,401	0,404	0,406	0,405	0,405

На характер градуировочного графика и на линейность в значительной степени могут оказывать влияние условия выполнения анализа: количество реактивов, концентрации анализируемых растворов и др. [7].

Линейность аналитической методики показывает, что внутри заданного диапазона методики существует прямо пропорциональное соотношение между концентрациями исследуемого вещества в растворе и оптической плотностью при выбранной длине волны (568 нм).

Линейность доказывалась на 9 различных разведениях модельной смеси гемостатического средства: 0,04; 0,0425; 0,045; 0,0475; 0,05; 0,0525; 0,055; 0,0575 и 0,06 мг/мл. Результаты представлены в таблице 4. По полученным значениям был построен калибровочный график, приведенный на рисунке 4, совместно с уравнением калибровочной кривой и коэффициентом корреляции.

Таблица 4.

Зависимость оптический плотности от концентрации

C_x, мг/мл	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{ср}$
0,04	0,1211	0,1215	0,1219	0,1211	0,1217	0,1216	0,1219
0,0425	0,1753	0,1759	0,1754	0,1756	0,176	0,1761	0,1758
0,045	0,2484	0,2489	0,2493	0,2493	0,2489	0,2479	0,2477
0,0475	0,3054	0,3054	0,3054	0,3054	0,3054	0,3054	0,3054
0,05	0,3551	0,3547	0,3555	0,3545	0,3548	0,3554	0,3543
0,0525	0,4185	0,4188	0,4186	0,4178	0,4175	0,4182	0,4182
0,055	0,4689	0,4681	0,4685	0,4689	0,4692	0,4695	0,4692
0,575	0,5332	0,5330	0,5327	0,5326	0,5334	0,5336	0,5338
0,06	0,6324	0,6321	0,6325	0,6328	0,6326	0,6321	0,6324

Полученные данные следует представлять в виде градуировочного графика с линией тренда, уравнения графика и величины коэффициента корреляции. Графическое представление линейности методики показано на рисунке 4.

Результаты по показателю «линейность» представлены в таблице 5. Основной характеристикой линейности является коэффициент корреляции, он составил 0,994.

Заключение по показателю «линейность»: для аналитических целей можно использовать методику, у которой зависимость функций от аргумента коррелируется с коэффициентом R (должен быть ≥0,99).

Таким образом, полученные результаты находятся в пределах допустимых отклонений, так как валидация по показателю линейность может варьировать в незначительных пределах. Также установлено, что

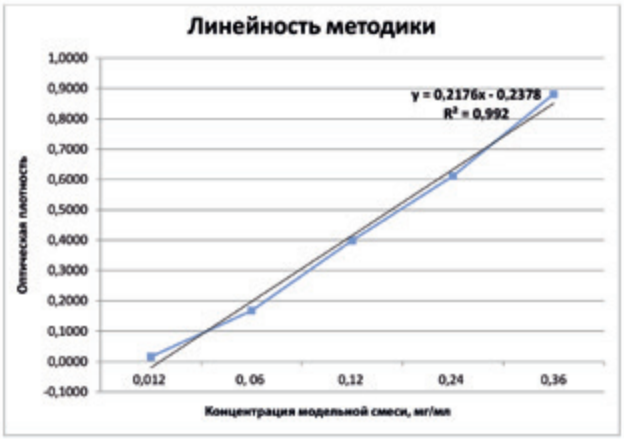


Рисунок 4. Графическое представление линейности фотометрического определения железа в гемостатическом средстве

во всем диапазоне полученных экспериментальных данных соблюдаются требования линейной модели (R≥0,99), следовательно, аналитическая область методики составляет 0,04–0,06 г/мл.

Таблица 5.

Результаты методики по показателю линейность

Характеристика	Статистические характеристики	Результаты
Линейность	Уравнение прямой	y=0,0611x+0,0564 R^2=0,994
	Наклон (a)	0,0611
	Коэффициент корреляции	R^2=0,994
	Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	0,0564

3. Правильность методики

Правильностью аналитической методики называется степень близости экспериментальных результатов к истинному значению во всей области измерений. Главным фактором, определяющим правильность, является значение систематической погрешности.

Для оценки правильности методик количественного определения субстанции применимы следующие подходы:

- применение аналитической методики к образцу с известной степенью чистоты, например к стандартному образцу;
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и прецизионность которого известны;

- заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность [9].

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения (P=95%). Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Правильность спектрофотометрического определения кислоты аминокапроновой в многокомпонентной лекарственной форме

Уровень С, %	$a_{ЛП}$, г	$a_{СО}$, г	$A_{ср}$	$A_{ст}$	X, г/мл	R, %	$R_{ср}$, %
80%	0,0402	0,0409	0,3190	0,3175	0,0402	99,9226	99,9913
80%	0,0405	0,0410	0,3250	0,3171	0,0420	103,7580	
80%	0,0409	0,0410	0,3290	0,3310	0,0407	99,4929	
100%	0,0500	0,0501	0,3992	0,4004	0,0499	99,9597	
100%	0,0500	0,0505	0,4001	0,4018	0,0503	100,5330	
100%	0,0499	0,0506	0,3900	0,3997	0,0488	97,6122	
120%	0,0603	0,0601	0,4513	0,4526	0,0599	99,4645	
120%	0,0602	0,0610	0,4502	0,4597	0,0597	99,1859	
120%	0,0600	0,0599	0,4498	0,4487	0,0600	99,9947	

Примечание: Уровень С – уровень аминокапроновой кислоты в сравнении с анализируемым в основном анализе,%; $a_{ЛП}$ – масса аминокапроновой кислоты в гемостатическом средстве, г; $a_{СО}$ – масса аминокапроновой кислоты (СО), г; $A_{ср}$ – среднее значение оптической плотности в анализируемом растворе; $A_{ст}$ – среднее значение оптической плотности в стандартном образце; X – содержание аминокапроновой кислоты в анализируемом образце, г/мл; R – открываемость методики, %; $R_{ср}$ – среднее значение открываемости методики, %.

Для тестирования методики на правильность готовятся модельные смеси с точным содержанием каждого из компонентов, включая и вспомогательные вещества. Согласно рекомендациям ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) необходимо проанализировать не менее 9 образцов на 3 уровнях концентраций [10]. Правильность методики устанавливается в указанном диапазоне ее применения. Для оценки полученных результатов наиболее простым и наглядным критерием служит открываемость (R), которая вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\text{найдено аналита}}{\text{взято аналита}} \times 100\%.$$

При проведении анализа будут получены 9 значений открываемости.

Для более детальной оценки следует статистически обработать полученные значения *R*, рассчитав статистические показатели качества результатов анализа при реализации методики анализа в лаборатории при доверительном интервале (P=95%) согласно [11]. Данные значения занесены в таблицу 7.

Таблица 7.

Статистические показатели *R* спектрофотометрического определения кислоты аминокапроновой в многокомпонентной лекарственной форме

Статистические показатели R	Результат, %
Среднее значение R	99,9913
Показатель повторяемости	1,6327
Предел повторяемости	4,5226
Показатель точности	3,9404
Показатель правильности	0,9805
Показатель внутрилабораторной прецизионности	1,7926

Заключение по показателю правильность: полученные результаты показывают, что методика позволяет проводить анализ кислоты аминокапроновой в многокомпонентной лекарственной форме с показателем правильности 0,9805%.

4. Внутрилабораторная прецизионность методики

Прецизионность методики характеризуется рассеиванием результатов, получаемых с ее использованием относительно величины среднего результата. Данная характеристика методики может быть оценена при помощи испытаний проб действующего вещества – аминокапроновой кислоты согласно требованиям [8]. Оценка проводилась исходя из данных, приведенных в таблице 6, по показателю X – содержанию аминокапроновой кислоты в анализируемом образце – путем расчета при доверительном интервале (P=95%) согласно [11].

Заключение по показателю внутрилабораторная прецизионность: полученные результаты показывают, что методика позволяет проводить анализ кислоты аминокапроновой в многокомпонентной лекарственной форме с показателем «внутрилабораторная прецизионность», составляющим 1,7926%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения аминокапроновой кислоты в многокомпонентном гемостатическом средстве, основанная на образовании красителя при взаимодействии с нингидрином. В качестве метода выбрана прямая спектрофотомет-

рия при длине волны 568 нм. Методика валидирована по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность.

Диапазон аналитической методики составил 0,04–0,06 г/мл. Методика может быть воспроизведена в лабораторных условиях при доверительной вероятности P=95% с правильностью 1,36%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.Н. Барсукова, О.А. Мельникова. Состояние фармацевтического рынка гемостатических лекарственных препаратов Российской Федерации // Сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий». Агентство перспективных научных исследований (АПНИ). 2016. № 7(3). С. 13–15.
2. Ю.Н. Барсукова, О.А. Мельникова. Состояние фармацевтического рынка гемостатических лекарственных препаратов Российской Федерации // Вестник Воронежского государственного университета. Сер.: Химия, биология, фармация. 2017. № 1. С. 138–142.
3. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата аминокапроновая кислота. Регистрационный номер: ЛП 002616-030816.
4. А.А. Блинникова. Спектрофотометрия и фотоэлектроколориметрия в анализе лекарственных средств: учебное пособие. – Томск. 2005. 96 с.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.: в 3 т. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. URL: http://www.femb.ru/feml (дата обращения 27.11.2016).
6. Т.А. Кобелева, А.И. Сичко, К.И. Илиев. Анализ местных анестетиков и натрия диклофенака в мягких лекарственных формах на титансодержащей основе: Монография. – Тамбов. 2017. 88 с.
7. О.Н. Кляшева, Т.И. Ярыгина, С.М. Басс, К.В. Ван. Использование реакции с нингидрином в количественном определении алифатических аминов // Современные проблемы науки и образования. 2003. Т. 3. С. 354.
8. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея РФ. XIII изд.
9. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. 49 с.
10. ICH Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology / ICH Harmonized Tripartite Guidelines. – Geneva. 1997.
11. РМГ 61-2010 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. 2010.



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 615.31

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ОКИСЛЕННОГО И ВОССТАНОВЛЕННОГО КОЭНЗИМА Q_{10} В БИОМАТЕРИАЛЕ (ОБЗОР)

В.И. Зозина[1]*, О.А. Горошко[2], Л.М. Красных[2], В.Г. Кукес[1,2]

Резюме. В организме человека коэнзим Q_{10} находится в окисленной и восстановленной формах и обнаруживается во всех органах. В обзоре рассмотрены современные методики ВЭЖХ-анализа коэнзима Q_{10} с использованием электрохимического, спектрофотометрического и масс-спектрометрического детекторов. В статье представлены данные по отбору проб, подготовке биоматериала к анализу и обеспечению стабильности коэнзима Q_{10} в биоматериале. Проведен сравнительный анализ используемых методик определения для окисленной и восстановленной формы коэнзима Q_{10} по чувствительности и селективности методов.

Ключевые слова: коэнзим Q_{10}, убихинон, убихинол, ВЭЖХ.

THE MODERN METHODS OF ANALYSIS OF OXIDIZED AND REDUCED FORMS OF COENZYME Q_{10} IN BIOMATERIAL (REVIEW)

V.I. Zozina[1]*, O.A. Goroshko[2], L.M. Krasnykh[2], V.G. Kukes[1,2]

Abstract. In the human body, coenzyme Q_{10} is in the oxidized and reduced forms and can be found in every organ. The review describes modern HPLC methods of coenzyme Q_{10} analysis using electrochemical, spectrophotometric and mass spectrometric detectors. In the article we present information on sampling, preparation of biomaterial for analysis and preservation of coenzyme Q_{10} stability in biomaterial. It is carried out a comparative analysis of the determination methodologies for the oxidized and reduced forms of coenzyme Q_{10} by its sensitivity and selectivity.

Keywords: coenzyme Q_{10}, ubiquinone, ubiquinol, HPLC.

1 – ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая д. 8, стр. 2

2 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Scientific Centre for Expert Evaluation of Medical Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky blv., Moscow, 127051, Russia

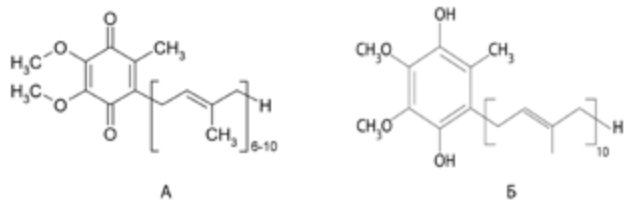
* адресат для переписки:
E-mail: jana26@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

Коэнзим Q_{10} (синоним – убихинон, кофермент Q_{10}, CoQ_{10}) представляет собой жирорастворимое соединение из класса бензохинонов – 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренил-1,4-бензохинон [1]. Кофермент Q_{10} обладает несколькими биохимическими функциями. Хорошо известны такие его функции, как сопряжение энергетических процессов в митохондриях и действие в качестве главного регенерирующего антиоксиданта [2]. Кофермент Q_{10} является существенной частью клеточного механизма, производящего АТФ, которая обеспечивает энергией сокращение мышц и другие жизненно важные клеточные функции. Основная часть процесса производства АТФ происходит во внутренней мембране митохондрий, где обнаруживается кофермент Q_{10}. Гораздо менее изучены такие функции, как окислительное действие при генерации сигналов и контроль окислительно-восстановительного состояния клетки [3].

Коэнзим Q_{10} играет важную роль в окислительном стрессе, который может быть определен как нарушение проокислительно-антиокислительного баланса и считается основной причиной старения и появления многих дегенеративных заболеваний.

Коэнзим Q_{10} в организме человека находится в двух формах: окисленной – убихинон – CoQ_{10} (рисунок 1А) и восстановленной – убихинол – $CoQ_{10}H_2$ (рисунок 1Б).



А Б

Рисунок 1. Структура убихинола (А) и убихинона (Б)

Соотношение убихинол/убихинон в крови является достоверным маркером окислительного стресса [4]. Интересным фактом является то, что при некоторых болезнях (респираторный дистресс-синдром у взрослых) сообщается об уменьшении соотношения убихинол/убихинон в плазме крови, которое сопровождается уменьшением концентрации аскорбата в плазме, а также появлением липидных гидроперикисей [5]. Этот факт позволяет сделать выводы о центральной роли убихинона в окислительно-восстановительной системе организма. Именно убихинол и проявляет эффект антиоксиданта, ингибируя супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, алкоксильные радикалы, а также восстанавливает α-токоферол из токофероксильных радикалов [6]. В организме CoQ_{10} обнаруживается во всех органах. На протяжении всей жизни содержание коэнзима Q_{10} в тканях и органах колеблется: достигает максимального значения к 20 годам, а затем с возрастом снижается: к 40 годам на 25%, к 75 – до 52% [7]. Содержание CoQ_{10} и $CoQ_{10}H_2$ в различных органах и плазме крови человека представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Содержание убихинона и убихинола в органах и плазме крови здорового человека

Биологический материал	CoQ_{10}	$CoQ_{10}H_2$	Литературный источник
Печень	54,9 мкг/г	52,1 мкг/г	[8]
Сердце	114, мкг/г	69,5 мкг/г	
Мозг	13,4 мкг/г	3,1 мкг/г	
Мышцы	39,7 мкг/г	25,8 мкг/г	
Плазма крови	0,12 мкг/мл	1,6 мкг/мл	[7, 9]

Было установлено, что соотношение убихинол/убихинон составляет 95/5, что указывает на существование CoQ_{10} в плазме в основном в восстановленной форме [10].

Кофермент Q_{10} обнаруживается в высоких концентрациях в клетках сердечной мышцы в связи с высокой потребностью этого типа клеток в энергии [11]. Нормальный уровень в крови составляет около 0,8–1,2 мкг/мл [3]. Чтобы значительно увеличить концентрацию кофермента, его требуется принимать в количестве по меньшей мере 100 мг/день, что приводит к увеличению уровня кофермента в крови приблизительно до 2 мг/мл. Высокая концентрация в крови необходима, чтобы кофермент Q_{10} поступил в ткани, испытывающие в нем недостаток. Снижение концентрации Q_{10} в плазме крови человека отмечается при ряде патологических состоянии, преимущественно при сахарном диабете, онкологических заболеваниях, кардиомиопатиях, сердечной недостаточности [2]. Уменьшить концентрацию CoQ_{10} в плазме способен ряд лекарственных препаратов.

Уровень коэнзима Q_{10} в плазме крови уменьшается примерно на треть у лиц, принимающих статины, поскольку при приеме статинов блокируется фермент ГМГ-КоА-редуктаза, являющийся ключевым не только в синтезе холестерина, но и коэнзима Q_{10}. Считается, что уменьшение плазматического уровня коэнзима Q_{10} вследствие приёма статинов провоцирует появление миопатии и рабдомиолиза [12].

Все вышесказанное приводит к необходимости диагностики и изучения способов коррекции вышеописанных патологий, для чего разрабатываются методы определения окисленной и восстановленной формы коэнзима Q_{10} в организме человека. На сегодняшний день самым распространенным методом определения коэнзима Q_{10} является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

ОТБОР И СТАБИЛЬНОСТЬ БИОПРОБ, СОДЕРЖАЩИХ УБИХИНОН И УБИХИНОЛ

В основном пробы крови отбирали в вакуумные пробирки с гепарином, цитратом натрия или ЭДТА, затем центрифугировали при 3000 g 10 мин и сразу же анализировали или хранили плазму до анализа при –80 °С. Скорость окисления убихинола в убихинон увеличивалась с увеличением температуры хранения [10, 13].

Проведенный эксперимент показал, что физиологический уровень эндогенного убихинола в плазме крови снижался уже в первые сутки хранения при –20 °С и его полное окисление происходило к 4-м суткам хранения. При этом общее содержание CoQ_{10} оставалось неизменным. Однако образцы плазмы крови, содержащей фармакологические концентрации убихинона, после приема препарата CoQ_{10} хранились в течение 14 дней при –20 °С без значительного изменения концентрации восстановленной формы убихинона [7].

Другие авторы показали, что содержание убихинола не менялось при хранении плазмы крови при 4 °С в течение 8 ч [14].

Существуют исследования, где показано, что убихинол нестабилен в крови, плазме и экстракте изопропанола, а соотношение убихинон/убихинол менялось уже в течение 1 ч после отбора образцов крови [15].

Для предотвращения окисления убихинола в сыворотку крови добавляли натрия аскорбат (5 мМ в 5 мМ фосфатном буферном растворе, pH 7,4) [16], бен-

зохинон [17], бутилгидрокситолуол (BHT) [18], а также смесь лимонной кислоты, цитрата натрия и декстрозы [13]. Среди различных изученных антиоксидантов смесь аскорбиновой кислоты (5%) и ЭДТА (0,1%) показала лучшую защиту, чем такие фенольные антиоксиданты, как бутилгидроксианизол, бутилгидроксистолуол или пропилгаллат [18].

Для стабилизации проб тканей их диспергировали на холоде в темноте с добавлением бутилгидрокситолуола для предотвращения окисления коэнзима Q_{10} [6, 16, 19, 20].

ПОДГОТОВКА БИОПРОБ К АНАЛИЗУ

Пробоподготовка является важным фактором получения адекватного результата анализа. Коэнзим Q_{10} и в окисленной, и в восстановленной форме – вещество нестойкое и фотолабильное, при анализе необходимо сохранить соотношение окисленной и восстановленной форм коэнзима, поэтому извлечение из биоматериала и приготовление стандартных растворов проводили на холоде, в посуде темного стекла и затемненном помещении или при тусклом свете.

Убихинон и убихинол хорошо растворяются в гексане, диэтиловом эфире, в смеси этанол : диэтиловый эфир, хуже в пропаноле, этаноле, этилацетате. Раствор убихинона в гексане стабилен не менее 1 мес при хранении при –20 °С [10].

Извлечение коэнзима Q_{10} из биологических жидкостей проводили методом жидкостной экстракции [15, 21] или методом осаждения белков различными растворителями: гексаном, с выпариванием в атмосфере азота и последующим суспендированием в смеси хлороформ : метанол 1:3 [6] либо охлажденным изопропанолом на ультразвуковой бане [20, 22], н-пропанолом [23], анализируя непосредственно экстракт.

Другие авторы [7, 13] проводили многократную обработку проб плазмы крови, органов смесью этанол (метанол) и н-гексан (1:2:5) [13] с упариванием гексанового слоя в атмосфере инертного газа и растворением в аликвоте этанола [21, 24] либо непосредственным анализом гексанового слоя, поскольку было показано снижение содержания убихинола и увеличение содержания убихинона после сушки гексанового экстракта в токе азота, хотя на эти процедуры потребовалось всего несколько минут [10]. Следует учесть, что жидкостная экстракция с использованием гексана, за которой следует выпаривание, приводит к значительному окислению убихинола. Значительно более быстрым и точным в определении соотношения убихинол/убихинон является метод одношаговой экстракции. Высокая липофильность пропанола, а также смешиваемость с водой приводила к более полной экстракции, нежели использование изопропанола или другого короткоцепочечного спирта [15].

Для улучшения экстракции CoQ_{10} из биологической матрицы, а именно отделения CoQ_{10} от липопротеинов, к плазме крови добавляли поверхностно-активные вещества, такие как додецилсульфат натрия, или Тритон X-100, или твин-20, а также изучали влияние температуры экстракции (4 °С и 19 °С) и типы пробирок (стекло и полипропилен) [13]. Было показано, что экстракция CoQ_{10} в полипропиленовой пробирке с твином-20 с концентрацией 3% при 4 °С смесью метанол : гексан по сравнению с экстракцией пропанолом обеспечила лучшую сохранность CoQ_{10} в пробе, а также хорошую воспроизводимость между повторами с коэффициентом вариации 4,3% и улучшение эффективности хроматографического разделения на 51,2% с УФ-детектированием [13, 16].

Для выделения убихинола и убихинона из тканей ткани гомогенизировали с физраствором или пропанолом, лиофилизировали, экстрагировали этанолом, н-гексаном [16, 24].

МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Для измерения уровня эндогенного CoQ10 существует много различных хроматографических методов, хемилюминесценция, спектрофлуориметрия [17], вольтамперометрия [24], однако наиболее часто используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с различными детекторами: ультрафиолетовым [7, 13, 22–27], электрохимическим [4, 6, 7, 14, 21, 28, 29] или масс-спектрометрическиим [1, 9, 15, 19, 20, 30–32]. Во многих методах избегают проводить разделение убихинола и убихинона, вместо этого химически окисляют убихинол и измеряют общий CoQ_{10} [23, 31].

ВЭЖХ с электрохимическим детектированием

При использовании электрохимического детектора (ЭХ) на жидкостном хроматографе для анализа окисленного и восстановленного CoQ_{10} перед внесением на колонку окисленную форму в экстракте плазмы восстанавливали до $CoQ_{10}H_2$ добавлением раствора натрия тетрагидробората в этаноле либо боргидрида натрия. Концентрацию окисленного CoQ_{10} вычисляли по разнице общего CoQ_{10} до восстановления и после восстановления [7]. Такой подход делает возможным окисление восстановленного убихинола на электрохимическом электроде. Разделение изучаемых веществ осуществлялось на обратимых фазах Phenomenex, Luna C18 [7], ОФ-Supelco-LC8 [10]. При этом использовались подвижные фазы: 0,3% NaCl в смеси этанол – метанол – 7% $HClO_4$ (975:15:10) [7], 50 Мм перхлорат натрия в смеси метанол – трет-бутанол (85:15) [10].

Предел обнаружения в плазме составил 0,005 мкг/мл [21]. Однако увеличение времени подготовки образца делает этот метод весьма трудоемким.

ВЭЖХ со спектрофотометрическим УФ-детектированием

В некоторых исследованиях для определения общего CoQ_{10} использовали метод ВЭЖХ с УФ-детектором. Хотя данный метод является недорогим и доступным, он недостаточно чувствителен для одновременного определения убихинона и убихинола в образце [33]. Поскольку CoQ_{10} является липофильным соединением, то для разделения применяли в основном обращенно-фазовые варианты хроматографии.

Авторы статьи [23] провели хроматографический анализ образцов плазмы крови на колонке Supelcosil LC18 при элюировании смесью этанол : метанол (65:35) с целью определения общего убихинона в концентрации 0,29 мкг/мл. В работе [22] описано определение общего убихинона в плазме крови путём разделения на хроматографической колонке Hypersil C18 при элюировании 10% изопропанолом в метаноле и обнаружении при помощи УФ-детектора с λ=275 нм. В этих исследованиях использовались предколонки [22, 23].

Подобные исследования проводились на обращенно-фазовых колонках C18 с различным составом и соотношением подвижных фаз: этанол [7], смесь метанол : гексан (85:15) [13], метанол-н-гексан (72:28) [26], изопропанол : метанол (60:40) [25], ацетонитрил : тетрагидрофуран : вода (55:40:5) [24].

Таким образом, определение CoQ_{10} возможно при использовании спектрофотометрического детектора при длине волны λ=275 нм для CoQ_{10} и λ=290 нм для $CoQ_{10}H_2$, однако этот детектор обладает более низкой чувствительностью, чем электрохимический детектор.

Возможно совместное применение УФ- и ЭХ-детекторов для улучшения селективности разделения. Некоторые исследователи использовали комбинацию ВЭЖХ с УФ- и ЭХ-детекторами для одновременного измерения убихинона и токоферолов [30].

Недавним открытием является использование микроэмульсионной жидкостной хроматографии. Хроматографическое определение проводилось при помощи колонки Synergi Gemini (4,6×250 мм). Поскольку CoQ_{10} является липофильным соединением, был применен метод микроэмульсионной жидкостной хроматографии, где в качестве подвижной фазы использовалась микроэмульсия типа «вода в масле». Положительной чертой микроэмульсии является более низкое давление в системе по сравнению с другими подвижными фазами. Предел обнаружения убихинона и убихинола при этом типе анализа более высокий по сравнению с обычной обращенно-фазовой хроматографией: 20 нг/мл и 100 нг/мл соответственно [9].

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

В настоящее время метод ВЭЖХ-МС/МС является одним из наиболее высокоселективных и чувствительных, что требуется для измерения низких концентраций эндогенного убихинона и убихинола в плазме крови для диагностики патологий.

При обнаружении убихинона методом масс-спектрометрии использовались обращенно-фазовые колонки C18 при элюировании смесью метанол : изопропанол : муравьиная кислота в соотношении 45:55:0,05 [2], или смесью изопропанола и метанола (1:4) [31], или смесью метанола с 5 мМ формиатом аммония [1, 15]. Соотношение m/z для убихинона составляло 880,7, а для убихинола – 882,7 m/z [1]. Продемонстрирована возможность одновременного определения окисленных и восстановленных форм коэнзима Q_{10} методом ВЭЖХ-МС без протекания каких-либо вторичных процессов во время детектирования в отличие от электрохимического (восстановительные процессы) или других видов детектирования (окисление убихинола во время анализа) [1].

В отличие от использования электрохимического детектора масс-спектрометр обладает более высокой чувствительностью. Авторы [20] провели анализ на колонке Synergi Hydro RP при элюировании подвижной фазы, в состав которой входило 60% изопропанола и 40% ацетонитрила. Использовали режим химической ионизации при атмосферном давлении с регистрацией отрицательных ионов (напряжение коронного разряда – 3 кВ, скорость подачи газа – 2,5 л/мин, температура источника – 275°C). Достигнуты пределы обнаружения $Q_{10}H_2$ и Q_{10}, составившие 30 и 5 нг/мл соответственно [20]. В других исследованиях при применении электрораспылительной ионизации предел обнаружения убихинола составил 15,8 нг/мл [1].

Другими авторами [32] предложен метод одновременного определения убихинона и убихинола с помощью усиленной ионизации раствором хлорида лития (LiCl) в режиме селективного мониторинга множественных реакций (MRM). Ионизация раствором LiCl и использование режима MRM открыли новую страницу в количественном определении CoQ_{10}. Разработанный метод является простым, быстрым, универсальным и чувствительным. Чувствительность данного метода возросла в 50 раз [32].

Кроме того, в современном анализе используется метод сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (UPLC) в тандеме с масс-спектрометрией и одношаговой экстракцией пропанолом. Несмотря на то, что стабильность убихинола в пропаноле ограничена, упрощенный процесс экстрагирования и скорость хроматографирования (4,2 мин) позволяет сделать большое количество анализов [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при помощи метода ВЭЖХ с УФ-детектором не представляется возможным определить соотношение убихинол/убихинон в плазме крови человека по причине его низкой чувствительности. В случае определения соотношения убихинол/убихинон методом ВЭЖХ с электрохимическим детек-

тором процесс пробоподготовки слишком трудоемок. Метод ВЭЖХ с МС-детектированием обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволяет широко его использовать в диагностических целях для определения соотношения убихинона и убихинола в качестве маркера окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Ruiz-Jimenez, F. Priego-Capote, J.M. Mata-Granados et al. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q_{10}) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress // J Chromatogr A. 2007. V. 1175(2). P. 242–248.
2. U. Singh, S. Devaraj, I. Jialal. Coenzyme Q_{10} supplementation and heart failure // Nutr Rev. 2007. V. 65. P. 286–293.
3. A. Mancini, R. Festa, R. Sebastiano et al. Hormonal influence on coenzyme Q(10) levels in blood plasma // Int J Mol Sci. 2011. V. 12(12). P. 9216–25.
4. L. Miles, M.V. Miles, P.H. Tang et al. Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress // Clin Chim Acta. 2005. V. 360(1-2). P. 87–96.
5. S. Yamashita, Y. Yamamoto. Simultaneous Detection of Ubiquinol and Ubiquinone in Human Plasma as a Marker of Oxidative Stress // Anal. Biochem.1997. V. 250. P. 66–73.
6. C. Leray, M.D. Andriamampandry, M. Freund et al. Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of alpha-tocopherol oxidation // J Lipid Res. 1998. V. 39(10). P. 2099–2105.
7. Е.И. Каленикова, Е.В. Харитонова, Е.А. Городецкая и др. Редокс-статус и фармакокинетика коэнзима Q_{10} в плазме крови крысы после его однократного внутривенного введения // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61(1). С. 125–131.
8. F. Aberg et al. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues // Arch Biochem Biophys. 1992. V. 295(2). P. 230–234.
9. А.В. Пирогов, Е.Б.Попов, М.В. Попик и др. Одновременное определение окисленной и восстановленной форм коэнзима Q_{10} в плазме крови методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 5. С. 86–91.
10. D. Armstrong. Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols // Methods in Molecular Biology. 2002. V. 186. P. 319.
11. R. Saini. Coenzyme Q_{10}: The essential nutrient // J Pharm Bioallied Sci. 2011. V. 3(3). P. 466–467.
12. H. Mabuchi. T. Hagashikata, M. Kawashiri et al. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients // J Atheroscler Thromb. 2005. V. 12(2). P. 111–119.
13. C.C. Ferreiro-Barros, E.K. Sugawara, L.R. Sanches. Determination of a method for extraction of coenzyme Q_{10} in human plasma: optimization of the use of surfactants and other variables // Einstein (Sao Paulo). 2012. V. 10(2). P. 203–238.
14. P.H. Tang, M.V. Miles, L. Miles et al. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma // Clin Chem. 2001. V. 47(2). P. 256–265.
15. A.J. Claessens, C.K. Yeung, L.J. Risler et al. Rapid and sensitive analysis of reduced and oxidized coenzyme Q_{10} in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to studies in healthy human subjects // Ann Clin Biochem. 2016. V. 53(2). P. 265–73.
16. G.M. Abdallah, S.M. El-Sayed, O.M. Abo-Salem. Effect of lead toxicity on coenzyme Q levels in rat tissues // Food Chem Toxicol. 2010. V. 48(6). P. 1753-1756.
17. M. Contin, M. Martinfeski, S. Lucangioli et al. New analytical strategies applied to the determination of Coenzyme Q_{10} in biological matrix // Methods Mol Biol. 2015. V. 1208. P. 409-420.
18. T.R. Kommuru, M. Ashraf, M.A. Khan et al. Stability and bioequivalence studies of two marketed formulations of coenzyme Q_{10} in beagle dogs // Chem Pharm Bull (Tokyo). 1999. V. 47(7). P. 1024–1028.
19. K. Teshima, T. Kondo. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography / turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase // Anal Biochem. 2005. V. 338(1). P. 12–19.
20. А.А. Бендрышев. Определение витаминов и коэнзимов Q_9 и Q_{10} в объектах со сложной матрицей методом жидкостной хроматографии: дисс. ... к.х.н. –М. 2012.
21. Е.В. Харитонова. Биофармацевтический анализ и фармакокинетика убидекаренона: дисс. ... к.фарм.н. –М. 2014.
22. P. Jiang, M. Wu, Y. Zheng, et al. Analysis of coenzyme Q(10) in human plasma by column-switching liquid chromatography // Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2004. V. 805(2). P. 297–301.
23. F. Mosca, D. Fattorini, S. Bompadre et al. Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step // Anal Biochem. 2002. V. 305(1). P. 49–54.
24. S.C. Andrade, R.P.F. Guine, L.C.P.Roseiro. Determination of the content of coenzymes Q_9 and Q_{10} in pork meat from different breeds // Foodbalt. 2014. P. 51–54.
25. O.F. Abdul-Rasheed, Y.Y. Farid. Development of a new high performance liquid chromatography method for measurement of coenzyme Q_{10} in healthy blood plasma // Saudi Med J. 2009. V.30(9). P. 1138–1143.
26. J. Karpinska, B. Micoluk, R. Motkowski et al. HPLC method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and coenzyme Q_{10} in human plasma // J Pharm Biomed Anal. 2006. V. 42(2). P. 232–236.
27. M.T. Rodriguez-Estrada, A. Poerio, M. Mandrioli et al. Determination of coenzyme Q_{10} in functional and neoplastic human renal tissues // Anal Biochem. 2006. V. 357(1). P. 150–152.
28. I.N. Acworth, P.A. Ullucci, P.H. Gamache. Determination of oxidized and reduced CoQ_{10} and CoQ_9 in human plasma/serum using HPLC-ECD // Methods Mol Biol. 2008. V. 477. P. 245–258.
29. M. Battino, L. Leone, S. Bompadre. High-performance liquid chromatography EC assay of mitochondrial coenzyme Q_9, coenzyme Q_9H_2, coenzyme Q_{10}, coenzyme $Q_{10}H_2$, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction // Methods Enzymol. 2004. V. 378. P. 156–162.
30. A.A. Franke, C.M. Morrison, J.L. Bakke et al. Coenzyme Q_{10} in human blood: native levels and determinants of oxidation during processing and storage // Free Radic Biol Med. 2010. V. 48(12). P. 1610–1617.
31. G. Hansen, P. Christensen, E. Tuchsen et al. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q_{10} in human serum by negative APCI LC-MS // Analyst. 2004. V. 129(1). P. 45–50.
32. D. Kotnik, P. Jazbek-Krizman, M. Krizman et al. Rapid and Sensitive HPLC-MS/MS Method for Quantitative Determination of CoQ_{10} // Research on Precision Instrument and Machinery (RPIM). 2013 V. 2(1). P. 6–13.
33. A. Hirayama, H. Kubo, M. Mita et al. High-sensitivity simultaneous analysis of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in human plasma // J Chromatogr Sci. 2008. V. 46(8). P. 717–721.

АНАЛИЗАТОР ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА БАЗЕ ГХ
AGILENT INTUVO 9000

Передовая технология: Анализаторы на базе ГХ Agilent Intuvo 9000



Введение

Определение остаточных растворителей – критически важная задача для фармацевтической промышленности. Правильный выбор растворителя в производстве может увеличить выход или повлиять на химические свойства синтезируемого продукта. Однако растворители не увеличивают эффективность продукта. Для обеспечения соответствия спецификациям и нормативам надлежащей производственной практики растворители необходимо удалить, насколько это возможно. Поэтому определение остаточных растворителей – это обязательная стадия в процессе производства или очистки.

В соответствии со статьей 467 фармакопеи США для этого используется анализ на одной колонке, с повторным анализом в случае превышения предельной концентрации. С помощью ГХ Agilent Intuvo 9000 с парофазным пробоотборником Agilent 7697A и делителем потока оба анализа можно параллельно провести на одной системе с двумя колонками и двумя детекторами.

Анализатор остаточных растворителей на базе ГХ Agilent Intuvo 9000 добавляет к инновациям Intuvo в области простоты использования улучшенный процесс разработки готовых прикладных решений с использованием готовых методик, разработанных компанией Agilent и поставляемых вместе с результатами с завода.

Обзор технической информации

- Специализированная готовая система, использующая ГХ Intuvo 9000, парофазный пробоотборник 7697A и колонки Agilent Ultra Inert.
- Анализаторы настраиваются и тестируются на заводе в сборе, с прилагающимися методиками, и поставляются с результатами заводских испытаний.
- После установки система тестируется еще раз на соответствие результатам заводских испытаний.

ГХ Intuvo 9000 можно сконфигурировать для работы с делителем потока, что позволяет использовать две колонки или два детектора. С помощью колонки Agilent Ultra Inert аналиты можно определять как количественно, так и качественно – по временам удерживания.

Оборудование

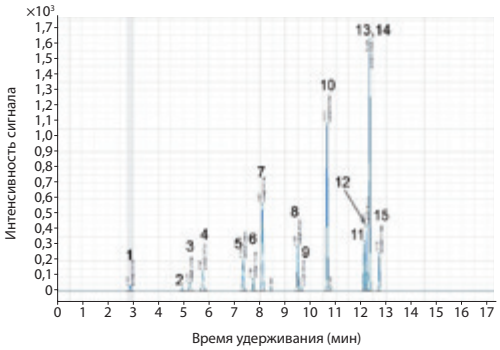
- Парофазный пробоотборник Agilent 7697A.
- ГХ Agilent 9000 Intuvo с делителем потока и двумя ПИД.
- Капиллярные колонки Agilent Ultra Inert для Intuvo: DB-Select 624 UI (123-0334UI-INT) и DB-WAX UI (123-7032UI-INT).
- Проверен на заводе Agilent и после установки на смеси остаточных растворителей Agilent, соответствующей требованиям статьи 467 фармакопеи США (5190-0492).

Результаты и обсуждение

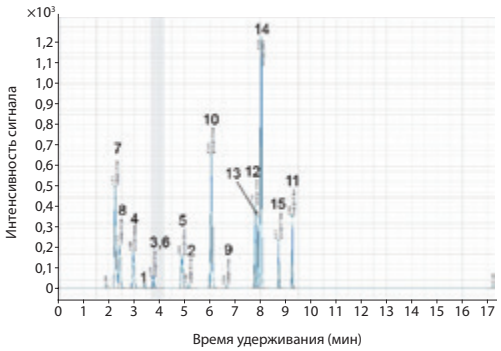
Анализатор остаточных растворителей Intuvo с парофазным пробоотборником 7697A и колонками Agilent Ultra Inert объединяет в себе компактность и простоту использования.

Надежное оборудование и готовое решение экономят время, необходимое для разработки методики, и позволяют получать быстрые и заслуживающие доверия результаты.

Agilent DB-624 Select UI (123-0334UI-INT).



Agilent DB-Wax UI (123-7032UI-INT).



Хроматограмма смеси остаточных растворителей (5190-0492) на капиллярной колонке Agilent Ultra Inert.

1. Метанол
2. Ацетонитрил
3. Хлористый метилен
4. Транс-1,2-дихлорэтилен
5. Цис-1,2-дихлорэтилен
6. Тетрагидрофуран
7. Циклогексан
8. Метилциклогексан
9. 1,4-диоксан
10. Толуол
11. Хлорбензол
12. Этилбензол
13. Мета-ксилол
14. Пара-ксилол
15. Орто-ксилол

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 615.21

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТОРИКОКСИБА В ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

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

Резюме. Разработана и проведена валидация методики количественного определения эторикоксиба в твердой лекарственной форме методом ВЭЖХ. Данная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. Приведены результаты валидации данной методики и апробации на выбранных объектах. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости. При использовании метода ВЭЖХ относительная погрешность составила 0,253%. Аналитический диапазон методики – от 25 до 85 мкг/мл.

Ключевые слова: валидация, эторикоксиб, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DEVELOPMENT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETORICOXIB IN SOLID PHARMACEUTICAL FORMS BY HPLC

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

Abstract. A sensitive and developed the validation method for quantification by using the chromatograph for Etoricoxib. The method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, precision and analytical range. The results of validation method and approbation at selected sites are given. It was shown than main validation characteristics meet the requirements. Using the HPLC method the dispersion was 0,253%. The analytical range of method is 25–85 μg/ml for HPLC.

Keywords: validation, etoricoxib, HPLC.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

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

* адресат для переписки:
E-mail: batalova@gilsinp.ru
Тел.: 8 (495) 676 43 60, доб. 2–24

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нестероидные противовоспалительные препараты занимают одно из первых мест по частоте клинического применения. Среди широкого спектра лекарственных препаратов выделяют группу коксибов, характеризующуюся меньшей частотой развития осложнений и нежелательных реакций в сравнении с другими НПВП. Эторикоксиб (5-хлор-6-метил-3-[4-(метилсульфонил)фенил]-2,3-бипиридин) (рисунок 1) принадлежит к классу коксибов, но существенно отличается по химической структуре от других представителей этого класса НПВП [1].

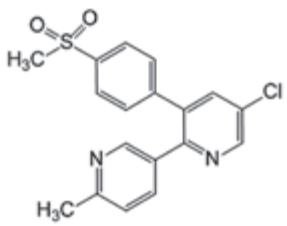


Рисунок 1. Структурная формула эторикоксиба

Структура определяет физические свойства вещества. Эторикоксиб практически нерастворим в воде и относится к соединениям липофильной природы. Для повышения растворимости используются различные физико-химические способы: получение полиморфных систем, образование твердых дисперсий или уменьшение размеров частиц. Следует отметить, что для разработки и изготовления твердых лекарственных форм на основе эторикоксиба используется фармацевтическая субстанция только кристаллической формы, поскольку аморфная форма эторикоксиба является нестабильной [2].

Особенности эторикоксиба обусловлены его фармакокинетическими свойствами: быстротой наступления эффекта и его длительностью. При действии изучаемого лекарственного средства

наблюдается селективное угнетение ЦОГ-2, которая отвечает за формирование боли и воспаления и, как следствие, характеризуется снижением клинических симптомов, зависимых от воспалительных процессов, без влияния на ЦОГ-1 [3, 4].

ФБУ «ГИЛС и НП» была разработана пероральная форма на основе субстанции эторикоксиба – «Эторикоксиб», таблетки, покрытые пленочной оболочкой. При исследовании твердых лекарственных форм одним из важнейших показателей является определение активного компонента в лекарственной форме. Для количественного определения эторикоксиба в разработанной лекарственной форме предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Целью данного исследования является разработка методики количественного определения эторикоксиба в твердой лекарственной форме методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для анализа использовались препарат – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, и модельная смесь. Состав препарата на одну таблетку и состав модельной смеси представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Состав препарата «Эторикоксиб», таблетки 60 мг и модельной смеси

Компоненты	Содержание в таблетке, мг	Модельная смесь, мг
Эторикоксиб	60	–
Кальция гидрофосфат	60	428
Целлюлоза микроскопическая	74	529
Кроскармелоза натрия	4,0	29
Магния стеарат	2,0	14
Масса ядра таблетки	200	1000
Оболочка опадрай, мг	8,0	–

Оборудование

При определении количественного содержания в препарате «Эторикоксиб, таблетки, покрытые оболочкой» методом ВЭЖХ хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Hitachi LaChrom Elite (Китай), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и диодной матрицей.

Взвешивание образцов проводили на весах Secura 225D-10RU (Sartorius Lab Instruments GmbH, Германия).

Используемые реактивы

Стандартный образец – эторикоксиб (Kekule Pharma Limited, Индия, серия ACE-3 WS001/15, годен до 11.2018); эторикоксиб, субстанция-порошок (Kekule Pharma LTC, серия ACE-0111G/ACE 1011G, годен до 10.2021); ацетонитрил (qradientqrade, ACS, Panreac, Германия, серия 361881.1611); вода очищенная.



Весы Secura 225D-10RU, Sartorius

Метод ВЭЖХ

Приготовление стандартного раствора эторикоксиба. Около 0,100 г стандартного образца эторикоксиба (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембранный фильтр Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление рабочего раствора эторикоксиба. Около 0,100 г субстанции эторикоксиба (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембранный фильтр Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление испытуемого раствора препарата. Около 0,15 г (точная навеска) порошка измельченных таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного испытуемого раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через

мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичную.

Приготовление раствора модельной смеси. Около 0,15 г (точная навеска) модельной смеси помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного испытуемого раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичную.

Приготовление подвижной фазы. Состав подвижной фазы: ацетонитрил – 0,05 М буферный раствор дигидрофосфата калия pH=4,2 (46:54). Подвижную фазу дегазируют, фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Условия хроматографирования

Для исследования были подобраны следующие хроматографические условия.

Колонка: Kromasil C8 250x4,6 мм, 10 мкм.

Температура колонки: 25±1 °С.

Детектор: УФ-спектрофотометрический, длина волны – 235 нм.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Подвижная фаза: Ацетонитрил – 0,05 М буфер дигидрофосфата калия pH = 4,2 (46:54).

Объем пробы: 25 мкл.

Время удерживания: 8,3 мин.

Время хроматографирования: 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию хроматографической методики определения эторикоксиба проводили по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность, прецизионность [5].

Для установления специфичности анализировали стандартный образец, модельную смесь, субстанцию эторикоксиба, таблетки на основе эторикоксиба, покрытые пленочной оболочкой. Состав модельной смеси приведен в таблице 1. На полученных хроматограммах время удерживания раствора испытуемого препарата и рабочего раствора совпало со временем удерживания стандартного раствора и составляло 8,3 мин. На хроматограмме модельной смеси пика не наблюдалось. На рисунках 2–5 приведены хроматограммы испытуемых образцов. Испытуемые образцы и результаты представлены в таблице 2.

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для оценки линейности были использованы стандартные растворы с номинальными концентрациями от 50 до 150% от номинального значения 50 мкг/мл (таблица 3).

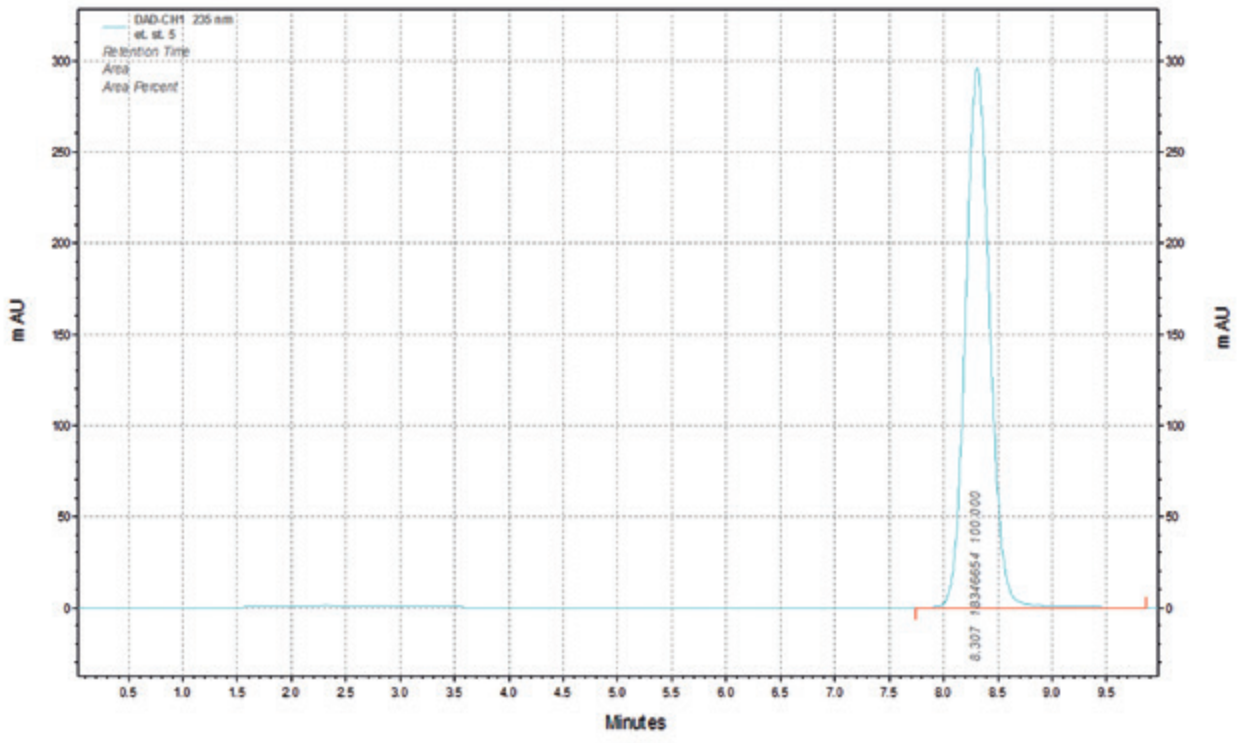


Рисунок 2. **Хроматограмма стандартного образца эторикоксиба**

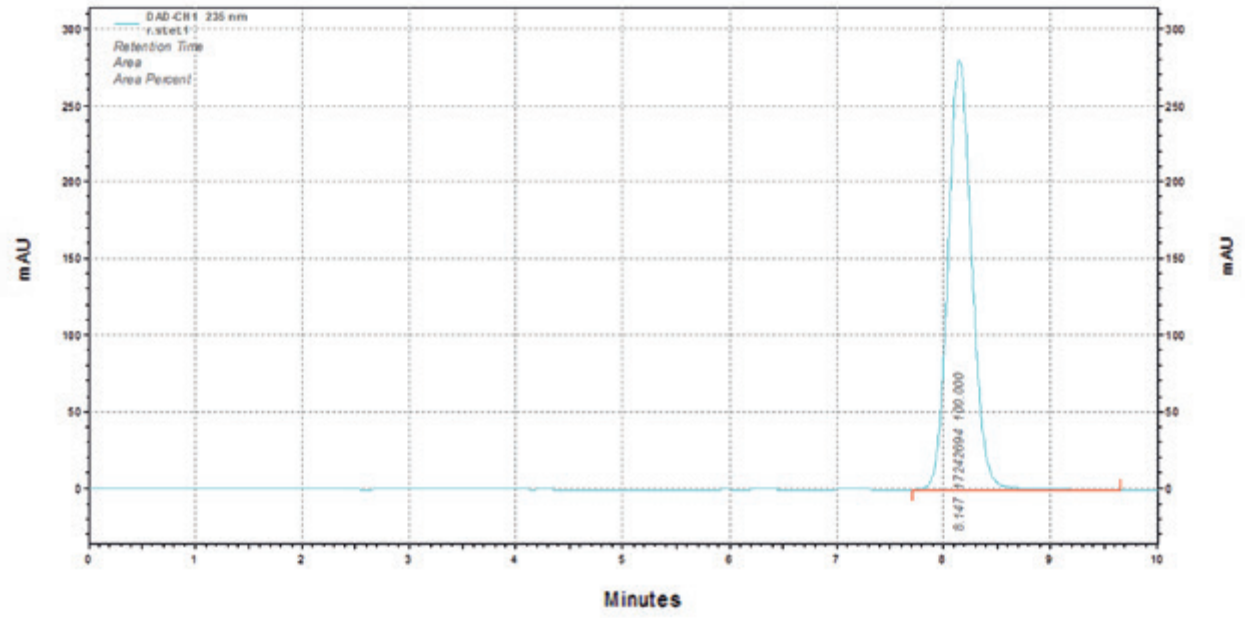


Рисунок 3. **Хроматограмма субстанции эторикоксиб**

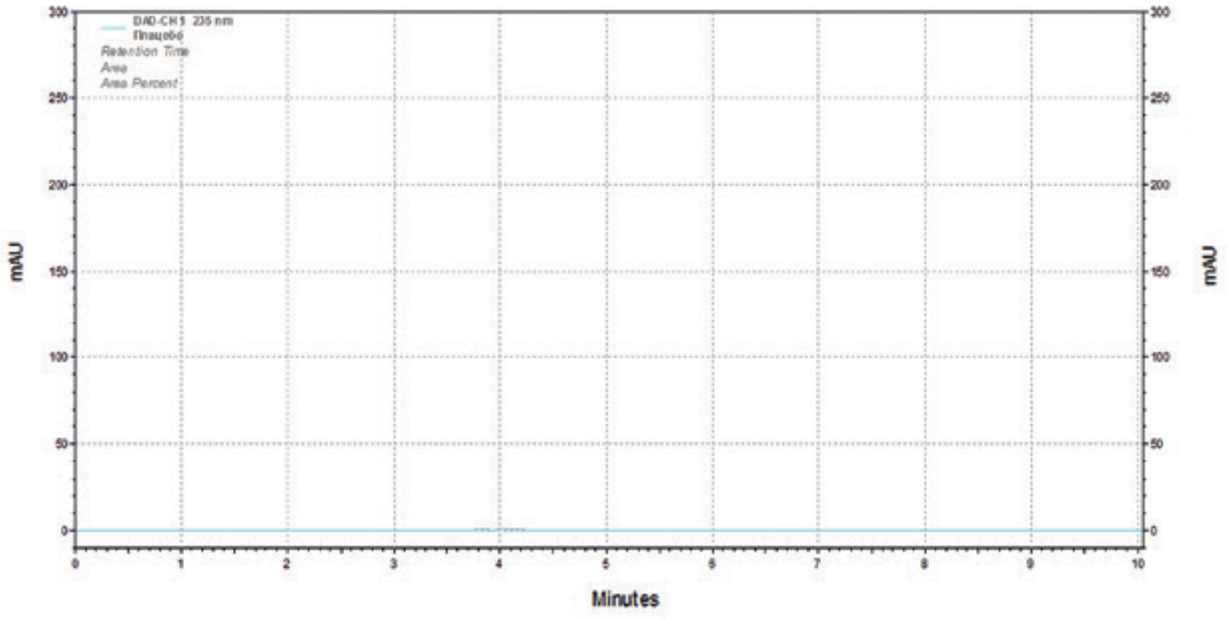


Рисунок 4. **Хроматограмма модельной смеси**

Таблица 2.

Данные для определения специфичности

№	Наименование образца	С, мкг/мл	Площадь пика, AU×c							Коэф. вариации
			A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{ср}$	
1	Стандартный образец (стандартный раствор)	50,1	16,393	16,482	16,237	16,532	16,518	16,371	16,422	0,681
2	Субстанция (рабочий раствор)	52,1	17,993	17,917	17,993	17,930	17,894	17,872	17,993	0,281
3	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой		15,194	15,280	15,243	15,219	15,326	15,310	15,262	0,341
4	Модельная смесь	–	–	–	–	–	–	–	–	–

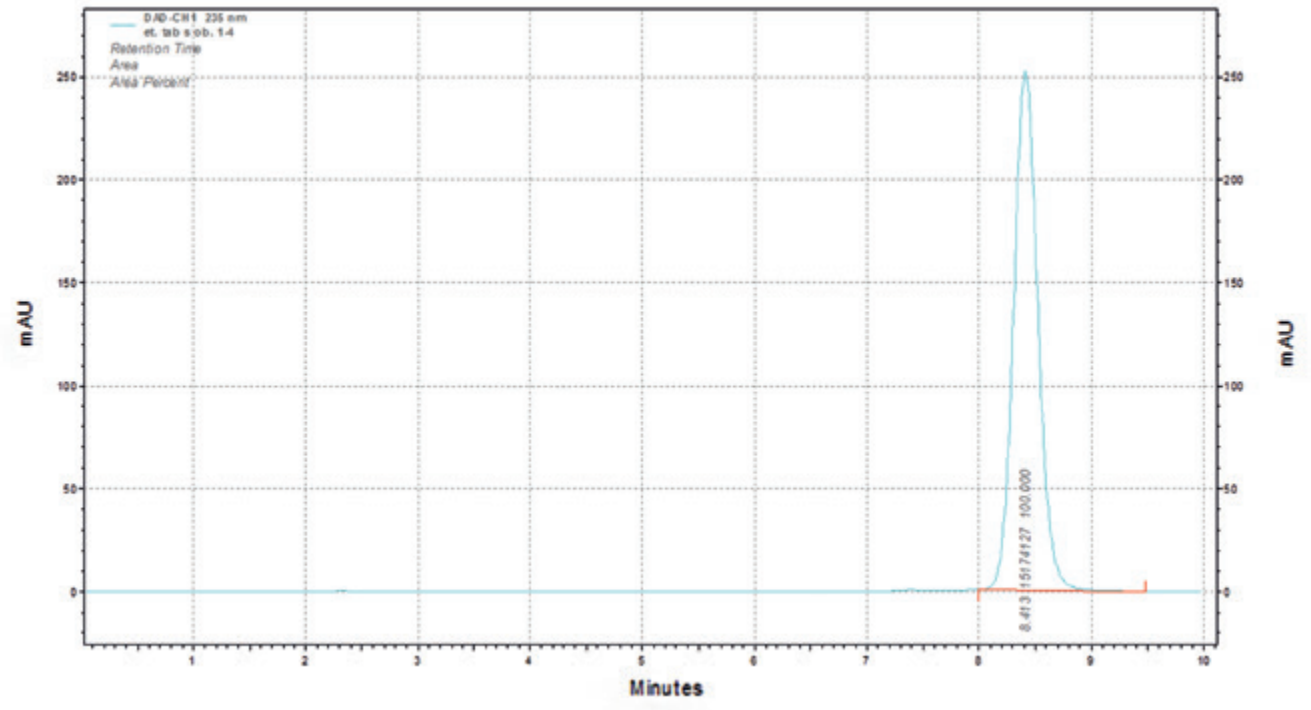


Рисунок 5. **Хроматограмма препарата в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой**

Таблица 3.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации эторикоксиба от площади пика

С, мкг/мл	Площадь пика, AU×c							Ст. откл	Коэф. вариации
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{ср}$		
28,4	9,734	9,729	9,716	9,694	9,676	9,725	9,712	0,023	0,234
45,4	15,491	15,390	15,423	15,314	15,410	15,452	15,413	0,060	0,389
50,1	16,794	16,907	16,843	16,920	16,748	17,079	16,882	0,117	0,691
68,2	22,572	22,827	23,051	23,135	23,076	23,240	22,984	0,243	1,058
85,2	28,568	28,882	28,883	28,932	28,910	29,018	28,866	0,154	0,534

Установлено, что график зависимости имеет линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описывается уравнением y=0,337x+0,0691. Полученные данные представлены на рисунке 6 в виде градуировочного графика с линией тренда, уравнения и коэффициента корреляции.

Повторяемость методики характеризует прецизионность методики при выполнении повторных испытаний в одинаковых рабочих условиях в пределах короткого промежутка времени. Сходимость была доказана при помощи испытаний субстанции эторикоксиба. Оценка проводилась путем расчета процента известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения сходимости представлены в таблице 4.

Относительное стандартное отклонение параллельных определений для 6 измерений составило 0,253%.

Промежуточная прецизионность характеризует влияние вариаций внутри лаборатории на результаты идентичных образцов, отобранных из одной и той же серии. Оценка проводилась путем расчета проценн-

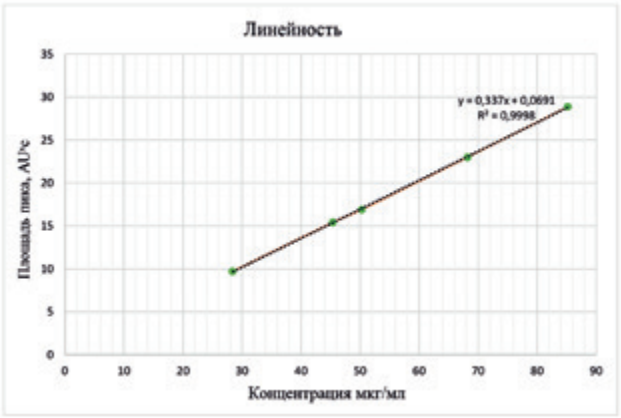


Рисунок 6. **График зависимости концентрации от площади пика для эторикоксиба**

та известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности двух аналитиков в разные дни представлены в таблице 5.

Таблица 4.

Повторяемость

№	A, AU×c	C, мкг/мл	Среднее, $X_{ср}$	σ	ε, %	Доверительный интервал	RSD [%]
1	17,049	50,38	50,42	0,050	0,25	50,42±0,11	0,253
2	17,075	50,46					
3	17,050	50,39					
4	17,083	50,49					
5	17,063	50,43					
6	17,041	50,36					

Таблица 5.

Промежуточная прецизионность

	№	A, AU×c	C, мкг/мл	Среднее	σ	ε, %	Доверительный интервал	RSD [%]
Первый химик	1	17,049	50,38	50,42	0,050	0,25	50,42±0,11	0,253
	2	17,075	50,46					
	3	17,050	50,39					
	4	17,083	50,49					
	5	17,063	50,43					
	6	17,041	50,36					
Второй химик	1	16,871	49,86	49,90	0,162	2,16	49,90±0,33	0,325
	2	16,847	49,78					
	3	16,825	49,72					
	4	16,963	50,13					
	5	16,872	49,86					
	6	16,941	50,07					

Относительное стандартное отклонение при определении внутрилабораторной прецизионности составило не более 2%.

Правильность аналитической методики выражает близость между принятым истинным и полученным значением. Правильность выражают величиной открываемости – соотношением между полученным средним и истинным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов.

Проводили анализ путем разбавления стандартного раствора. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Процент открываемости эторикоксиба (правильность)

Уровень концентрации	A, AU×c	Найдено C, мкг/мл	Среднее	RSD [%]	Процент открываемости
80%	14,900	40,60	40,65	0,844	101,625
	14,971	40,84			
	14,727	40,52			
100%	18,462	50,75	50,82	0,487	101,640
	18,579	51,05			
	18,402	50,65			
120%	22,086	60,90	60,98	0,136	101,633
	22,091	61,26			
	22,037	60,78			

Процент открываемости составляет от 101,625% до 101,640%.

Аналитический диапазон методики соответствует диапазону линейности и составляет от 25 до 85 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения эторикоксиба в таблетках методом ВЭЖХ. Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля качества твердой лекарственной формы эторикоксиба по показателю «количественное определение», что соответствует поставленной задаче. Методика обладает достаточной точностью и селективностью, диапазон концентраций составляет от 50 до 150% от номинального значения 50 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.M. Kaushal, A.K. Chakraborti, A.K. Bansal. FTIR Studies on Differential Intermolecular Association in Crystalline and Amorphous States of Structurally Related Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434918 (дата обращения 10.01.2018).
2. P.S. Gangane, S.M. Bagde, S.G. Mujbaile, K.D. Niranjane. Development and Validation of HPLC Assay Method for Etoricoxib in Bulk Drug and Tablet Formulation. URL: http://www.ijser.in/archives/v2i6/SjIwMTMzMDk=.pdf (дата обращения 10.01.2018).
3. B. Hinz, K. Brune. Cyclooxygenase-2 – 10 yearslater // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. № 300(2). P. 367–375.
4. H. Vanegas, H. Schaible. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cycloxygenases] in the spinal cord // Prog. Neurobiol. 2001. № 64(4). P. 327–363.
5. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик / Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. С. 222.

УДК 543.544; 615.074

ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ВЭЖХ И УЭЖХ: СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД, ВКЛЮЧАЮЩИЙ АНАЛИЗ РИСКОВ

Н.А. Эпштейн[1]*, В.Л. Севастьянова[1], А.И. Королева[1]

Резюме. Предложен новый подход к исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, включающий анализ рисков. Он дает возможность надежно обосновывать как выбор, так и исключение определенных факторов при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Подчеркнуто, что исключение любого фактора, связанного с хроматографической системой, из исследования робастности при валидации конкретной методики должно быть надежно обосновано: с привлечением анализа рисков, включающего рассмотрение особенностей хроматограмм и теоретических аргументов. Уровень риска факторов определяется с использованием специальной матрицы и таблицы для оценки критичности фактора и вероятности его критического воздействия на отклики. Приведены и обсуждены основанные на собственном опыте и литературных данных ориентировочные значения пределов изменения факторов, часто имеющих высокий и средний уровень риска. Приведены также ориентировочные значения для допустимых пределов изменения откликов и пример оценки робастности методики определения примесей с помощью анализа рисков и метода «one-factor-at-a-time». Даны рекомендации по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Ключевые слова: робастность, риск, пределы изменения факторов, пределы изменения откликов, валидация, ВЭЖХ, УЭЖХ.

INVESTIGATION OF ROBUSTNESS AT VALIDATION OF HPLC AND UPLC METHODS: A MODERN APPROACH INCLUDING RISK ANALYSIS

N.A. Epshtein[1]*, V.L. Sevastianova[1], A.I. Koroleva[1]

Abstract. A new approach to the robustness investigation of HPLC/UPLC methods that includes use of risk analysis is offered. It allows reliable justification of the choice as well as omission of certain factors at study of the robustness of HPLC/UPLC methods. The risk level of factors is determined using a special matrix and a table to assess the criticality of the factor and the probability of its critical impact on responses. It is emphasized that the exclusion of any factor associated with the chromatographic system from investigation of robustness at validation of a concrete method has to be reliably justified – with the use of a risk analysis including consideration of the features of chromatograms and theoretical arguments. For the factors that often have the high and average level of risk, we provide and discuss the guide values for the limits of the factor change based on our own experience and literary data. We also suggest the guide values for permissible limits of the responses variation as well as an example of assessment of robustness of the method for determining impurities using risk analysis and «one-factor-at-a-time» method. Recommendations are made to study of the robustness of HPLC/UPLC methods.

Keywords: robustness, risk, factor change limits, response change limits, validation, HPLC.

1 – Автономное объединение «ШТАДА ФармДевелопмент» АО «НИЖФАРМ», 109029, Россия, г. Москва, Автомобильный проезд, д. 6

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», SC «NIZHPHARM», 6, Avtomobilny Proyezd, Moscow, 109029, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: naumepshtein@gmail.com
Тел.: 8 (985) 771 73 59

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время **робастность** (robustness) аналитических методик (АМ) рассматривают как одну из валидационных характеристик [1, 2], в то время как в прежние годы робастность рекомендовали исследовать только на стадии разработки АМ [3]. Однако если в USP робастность – это обязательная валидационная характеристика, то в ГФ XIII указано, что при валидации АМ устойчивость (точнее – робастность) «может определяться при необходимости» [2]. При этом в ГФ XIII не указаны критерии для оценки такой «необходимости», что на практике означает необязательность исследования робастности при валидации АМ в РФ. Между тем наш опыт экспертизы досье зарубежных фирм на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты дает основание сделать вывод, что для зарубежных фирм уже стало нормой включение данных по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ в разделы CTD 3.2.S.4.3 и 3.2.P.5.3 («Валидация аналитических методик»). В связи с этим очевидно, что и в РФ станет обязательным включение исследования робастности АМ в валидационную документацию, и к этому надо быть готовыми теоретически и практически.

Общепризнанное определение термина «робастность» в отношении аналитических методик дано в ICH Q2(R1): *«робастность аналитической методики является показателем ее способности не поддаваться воздействию небольших, но*

контролируемых изменений в ее параметрах, а также надежности методики в нормальных условиях ее применения» [3]. В ICH Q2(R1) также говорится, что оценка робастности «должна демонстрировать надежность анализа под влиянием контролируемых изменений в параметрах метода. Если результаты измерений подвержены воздействию изменений условий применения методики, необходимо обеспечить надлежащий контроль таких условий либо включить в описание методики соответствующее предупреждение. Одним из результатов оценки робастности должно быть определение характеристик пригодности системы (например, разрешения), обеспечивающих пригодность аналитической методики в любых условиях применения» [2, 4]. Иногда термин *robustness* переводят не как *«робастность»,* а как *«устойчивость»,* например в ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIII [2]. В общем случае это правильно. Однако при рассмотрении вопросов, связанных с валидацией аналитических методик, *robustness лучше переводить именно как «робастность»,* поскольку имеется еще один валидационный термин – ruggedness [1], основное значение которого переводится как «устойчивость» (ruggedness соответствует внутрилабораторной прецизионности [1; 4, с. 152]).

В [4] в соответствии с приведенным выше определением робастности подчеркивается, что «решение о том, какие именно изменения могут считаться незначительными, но контролируемыми, зависит от типа методики и принимается самим аналитиком». Эта формулировка нуждается в существенном дополнении: решение о том, какие именно изменения могут считаться незначительными, но контролируемыми и какие факторы необходимо включить в исследование робастности методики, зависит от типа методики и принимается самим аналитиком *на основании анализа рисков*. Это чрезвычайно важное дополнение, так как в соответствии с ICH Q9 при разработке любых процессов и процедур предварительно должен быть проведен анализ рисков [5]. Анализ рисков дает возможность научно обоснованно включать или исключать факторы при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Цель статьи: рассмотреть исследование робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ с привлечением анализа рисков; представить и обсудить апробированные на практике значения пределов изменения факторов, а также допустимых пределов изменения откликов, на которые можно ориентироваться при валидации методик, а также дать рекомендации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РАБАСТНОСТИ

При исследовании робастности аналитических методик обычно применяют один из двух основных методов.

1. Метод одновременного исследования влияния на робастность методики только одного фактора при постоянстве значений всех остальных факторов – метод «one-factor-at-a-time» [4, 6–7] (альтернативное название этого метода «One-variable-at-a-time procedure» [8]). Суть метода заключается в том, что при оценке робастности методики последовательно изменяют значение только одного из **факторов**, потенциально способных влиять на **контролируемые отклики**, и оценивают критичность влияния каждого фактора на выполнение требований к этим откликам. Например, сначала изменяют (варьируют) только температуру колонки, а значения остальных факторов остаются неизменными, как в валидируемой методике, затем варьируют только скорость потока и т.д. При этом значение варьируемого фактора берут на определенном верхнем (+1) и на нижнем (–1) пределе/уровне его изменения относительно значения, указанного в методике.

Типичные факторы для методик ВЭЖХ/УЭЖХ приведены на рисунке 1 и в таблице 1, а **контролируемые отклики** (то есть те, которые должны контролироваться при исследовании робастности методики) приведены в таблице 2.

Критерием робастности аналитической методики является то, что ни один из факторов на пределе/уровне его изменения (+1) или (–1) не способен вызвать такого изменения отклика, что отклик выйдет за допустимый предел. Если установлено, что на пределе изменения фактора хотя бы один из откликов выходит за допустимый предел (критический фактор), то пытаются скорректировать допустимый предел изменения отклика, а если это невозможно – предел изменения фактора, так чтобы значение отклика укладывалось в допустимый предел.

2. Метод математического планирования экспериментов (Design of Experiments; DOE) – метод одновременного исследования влияния нескольких факторов на робастность методики с использованием определенного плана (матрицы) экспериментов. При этом чаще всего используют двухуровневые планы Плакетта – Бермана (Plackett – Burman design), так как они требуют меньшего количества экспериментов по сравнению с другими планами [4, 6–8]. В матрице этих планов каждая строка представляет собой определенную комбинацию всех рассматриваемых факторов на их верхнем (+1) или нижнем (–1) пределе/уровне изменения относительно значения, указанного в методике. Определяют значимые (потенциально критические) факторы и пределы изменения для этих факторов, а также «наихудшие случаи» (the worst-case situation [6]). Для «наихудших случаев» определяют допустимые пределы изменения откликов. Это повышает надежность обоснования требований к пригодности хроматографической системы [6–8]. Определенным недостатком метода DOE является то, что иногда выводы о значимости факторов могут зависеть от критериев значимости, использованных при исследовании робастности методики [9]. Поэтому при исследовании робастности методик с помощью метода DOE рекомендуем для оценки значимых факторов использовать не менее 2–3 критериев [6–9].

Таблица 1.

Обобщенная оценка рисков, связанных с тем, что при тестировании робастности методики ВЭЖХ/УЭЖХ не будет исследовано влияние отдельных факторов, потенциально способных влиять на результаты анализов

№	Объект/фактор*	Критичность	Вероятность	Риск	Примечание
1	2	3	4	5	6
Факторы, связанные с хроматографической системой → исследование робастности при валидации методики					
1.	Состав подвижной фазы (ПФ): содержание более сильного элюента/элюентов в ПФ	Высокая	Средняя	Высокий	Только при изократическом элюировании. Влияние варьирования состава ПФ рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
2.	Состав ПФ: содержание ион-парного реагента	Высокая	Высокая	Высокий	См. рекомендацию выше.
3.	Состав ПФ: содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп	Средняя	Средняя	Средний	То же.
4.	Буфер: значение pH буфера	Высокая	Средняя	Высокий	Влияние pH буфера рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
5.	Буфер: концентрация соли в буфере или ионная сила буфера	Средняя	Средняя/ Высокая	Средний/ Высокий	Риск высокий только для ион-парной и для ионообменной хроматографии.
6.	Скорость потока ПФ	Средняя	Средняя	Средний	Этот фактор рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
7.	Градиент: значение наклона градиента (G)	–	–	–	Влияние фактора G обычно не исследуют. Ограничиваются исследованием влияния более сильного элюента/элюентов в начальной (B_{min}) и в конечной (B_{max}) точках градиента (строки 8 и 9). Этого достаточно, т.к. $G=(B_{max}-B_{min})/\Delta_G$ зависит от B_{max} и B_{min}, а продолжительность градиента Δ_G (время) задается с высокой точностью.
8.	Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{min}	Высокая	Высокая	Высокий	Влияние варьирования состава ПФ рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
9.	Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{max}	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
10.	Градиент: длина изократического участка (кроме участка в конце градиента)	Средняя	Высокая/ Низкая	Высокий/ Низкий	Вероятность и риск высокие только при определенных условиях (см. текст). Влияние длины изократического участка в конце градиента на контролируемые отклики, как правило, исследуют при разработке методики.
11.	Градиент: Dwell Volume	–	–	–	Влияние Dwell Volume учитывается в факторе «хроматограф».
12.	Температура колонки	Средняя	Низкая	Средний	Влияние температуры рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
13.	Температура образца	Средняя	Низкая	Средний	Влияние температуры образца исследуют только в случае термолабильных лекарственных веществ.
14.	Мертвый объем при изократической хроматографии	–	–	–	Влияние мертвого объема учитывается в факторе «хроматограф».
15.	Чувствительность детектора	Высокая	Средняя	Высокий	Критичность и риск высокие только для методик определении примесей. В остальных случаях риск низкий. Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
16.	Длина волны	Высокая	Средняя	Высокий	Риск высокий для методик определения примесей. Для остальных методик риск низкий.
17.	Инжектор (воспроизводимость инжектируемых объемов растворов)	Средняя	Низкая	Низкий	Риск низкий для современных хроматографов.

Окончание табл. 1

№	Объект/фактор*	Критичность	Вероятность	Риск	Примечание
1	2	3	4	5	6
18.	Колонка (серия сорбента)	Средняя	Средняя	Средний	Влияние серии сорбента рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3].
19.	Хроматограф	Средняя	Средняя	Средний	Проводят анализ испытуемого раствора одного и того же образца на одной и той же колонке на двух хроматографах. При этом оценивается совокупное влияние разных факторов: мертвый объем (изократика) или Dwell Volume (градиент) и т.д. на робастность методики.
20.	Шум базовой линии	Высокая	Низкая	Низкий	При исследовании робастности методик этот фактор не рассматривают, так как в современных методиках определения примесей, а для других методик – при необходимости, предварительно проверяют выполнение требования к отношению «сигнал – шум» базовой линии (S/N) при хроматографировании раствора для проверки чувствительности хроматографической системы [19].
21.	Длительность уравновешивания системы до начала хроматографирования и в конце градиента	Высокая	Средняя	Высокий	Влияние этих факторов на отклики обычно исследуют на стадии разработки методики.
22.	Длительность хроматографирования	Высокая	Средняя	Высокий	То же (Примечание: при недостаточной продолжительности хроматографирования пики от предыдущей инжекции могут оказаться на хроматограмме последующей инжекции или, что труднее заметить, выходить между инжекциями).
23.	Раствор для промывки инжектора	Средняя	Средняя	Средний	То же.
24.	Состав раствора для промывки иглы	Средняя	Средняя	Средний	То же.
Факторы, связанные с пробоподготовкой → исследование робастности при разработке методики					
1.	Экстрагент: отношение компонентов и pH	Высокая	Средняя	Высокий	Робастность методики по отношению к этим факторам исследуют на стадии разработки методики.
2.	Отношение массы анализируемого образца к объему экстрагента	Средняя	Низкая	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют редко, причем на стадии разработки методики.
3.	Температура экстракции	Средняя	Средняя	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
4.	Продолжительность экстракции	Средняя	Средняя	Средний	То же (рекомендуется включать в исследование робастности методик в соответствии с ICH [3]).
5.	Продолжительность обработки ультразвуком	Средняя	Средняя	Средний	Робастность методики по отношению к этому фактору исследуют на стадии разработки методики.
6.	Продолжительность встряхивания	Средняя	Средняя	Средний	То же.
7.	Фильтр: тип	Высокая	Средняя	Высокий	То же.
8.	Фильтр: диаметр пор	Средняя	Средняя	Средний	То же.
9.	Стабильность растворов	Высокая	Средняя	Высокий	То же (результаты исследования стабильности растворов, как правило, включают в отчеты о валидации методик отдельным пунктом).
10.	Действие света	Средняя	Средняя	Средний	То же.
11.	Ступка (фарфоровая или агатовая)	Средняя	Средняя	Средний	То же.
12.	Дериватизация: продолжительность	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
13.	Дериватизация: температура реакции	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
14.	Дериватизация: концентрация дериватизирующего агента	Высокая	Высокая	Высокий	То же.
15.	Погрешность мерной посуды	Средняя	Низкая	Низкий	Робастность методики по отношению к этому фактору, как правило, не исследуют.

Примечание: *Жирным шрифтом выделены факторы, которые часто применяются для исследования робастности при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Таблица 2.

Отклики, которые в общем случае необходимо контролировать при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, и их допустимые пределы изменения

№	Отклики (Y)	Обозначение	Единица измерения	Ориентировочные значения допустимых пределов изменения откликов
Отклики, которые используются при оценке уровня риска факторов и при исследовании робастности методик				
1.	Число теоретических тарелок	N	т.т.	Требование по валидируемой методике.
2.	Фактор асимметрии пика основного вещества	$T_{0,05}$ (или A_S)	–	То же.
3.	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	R_S (SS) или ν (SS)	–	То же.
4.	Разрешение между двумя другими обсчитываемыми пиками (не указанными в System Suitability), которые наиболее сильно перекрываются, а если таких нет, то между наиболее близко расположенными пиками на хроматограмме испытуемого раствора*	R_S (imp) или ν (imp)**	–	Если на хроматограммах возможно частичное перекрывание пиков, то использовать Peak-to-valley ratio $\nu \geq 1,5$ [21].
5.	Относительное стандартное отклонение площади/высоты пика	RSD	%	Требование по валидируемой методике.
6.	Отношение «сигнал – шум» S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы	S/N	–	То же.
7.	Время удерживания основного вещества при изократическом режиме	RT	мин	±10%.
8.	Время удерживания основного вещества при градиентном режиме	RT	мин	±15% [13].
9.	Относительные времена удерживания веществ, указанные в методике	RRT	-	±10% – для изократических методик; ±15% – для градиентных методик.
10.	Спектральная чистота пиков лекарственных веществ и пиков примесей, для которых используются поправочные коэффициенты	Purity	–	Критерии, подтверждающие спектральную чистоту пиков (Purity Plot и количественные критерии).
Отклики, которые используются только при исследовании робастности методик				
11.	Содержание основного вещества	C_0	%	±2,0% – типичное значение для ГЛС; $\pm(B_H–100)$ – для субстанций [22, 23], где B_H – верхняя граница нормируемого содержания основного вещества в %.
12.	Содержание идентифицированной примеси	C_{ID}	%	Допустимый предел изменения отклика относительно значения, полученного при номинальных условиях хроматографирования: ±10% для примесей >1,0%; ±25% для примесей от > 0,1% до 1,0%; ±50% для примесей до 0,1%.
13.	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	C_U	%	То же.
14.	Сумма примесей	∑imp	%	То же для ∑imp.

Примечание: *Этот отклик предназначен для контроля «наихудшего случая» разделения между пиком примеси и другим пиком (чаще всего другой примеси) на хроматограмме испытуемого раствора. Однако на хроматограмме испытуемого раствора может иметься несколько пар частично перекрывающихся (а если таких нет, то близко расположенных) пиков примесей. В этом случае каждую пару таких пиков следует рассматривать как потенциально «наихудший случай», поскольку разрешение между пиками любой из этих пар может оказаться критическим при исследовании робастности методики. Соответственно рассматривают несколько таких откликов, идентифицируемых, например, по RRT одного из пиков пары.

**R_S (imp) или ν (imp), так как хотя бы один из пиков, используемых для расчета этого отклика, является пиком примеси (impurity).

Примечание. В таблицу не включен еще один отклик – поправочный коэффициент CF (Correction Factor), который обычно слабо зависит от большинства факторов, за исключением длины волны, температуры колонки / подвижной фазы [20] и pH. Влияние этих факторов на CF лучше проверять при разработке методики, чтобы при валидации не столкнуться с проблемой недостаточной чувствительности методики.

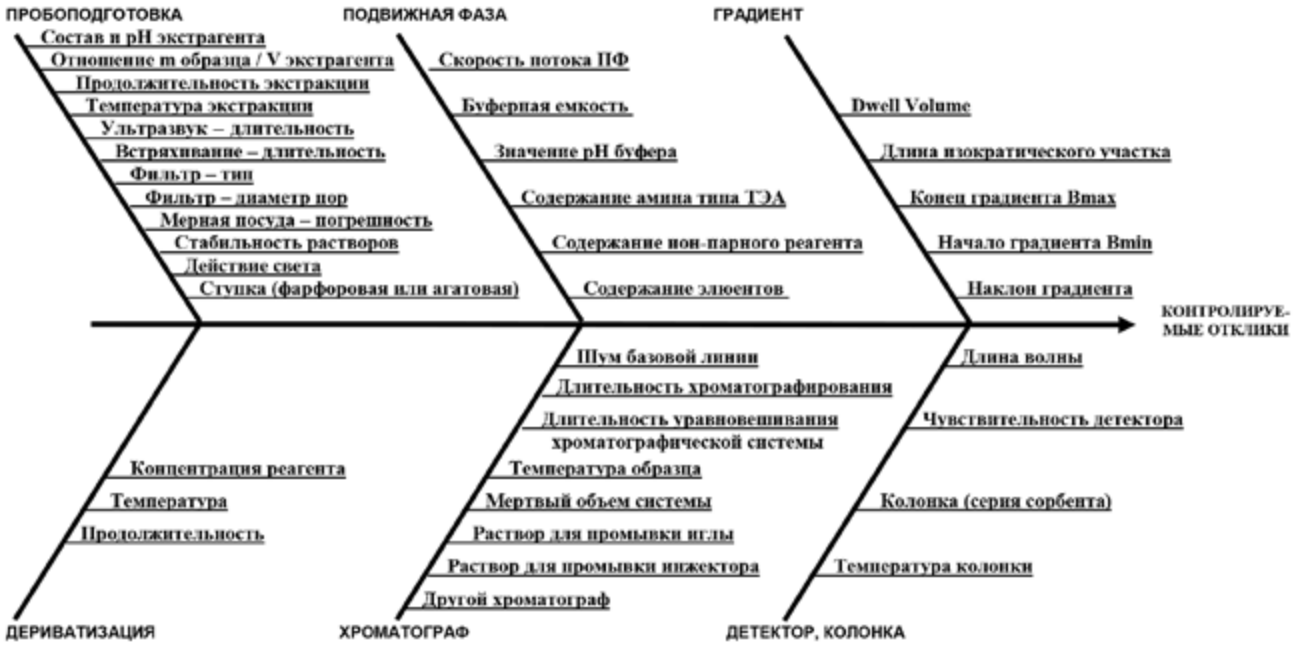


Рисунок 1. Диаграмма Исикавы для факторов, потенциально способных влиять на контролируемые отклики и, следовательно, на робастность методики ВЭЖХ/УЭЖХ[1] (контролируемые отклики – это требования к пригодности хроматографической системы, нормы содержания основных веществ и примесей по спецификации и т.д.; пояснения даны в тексте), V – объем; m – масса

С теоретической точки зрения оценка робастности методик с помощью метода DOE более надежна по сравнению с методом «one-factor-at-a-time». Однако метод «one-factor-at-a-time» пока используют чаще, чем DOE, поскольку он намного проще, нагляднее и не требует применения компьютерных программ.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ВЭЖХ/УЭЖХ

Схему нового подхода к исследованию робастности при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ можно представить следующим образом.

1. Строят диаграмму Исикавы, учитывающую факторы, потенциально способные влиять на контролируемые отклики. Пример для обобщенного случая исследования робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ показан на рисунке 1. Заметим, что для конкретной методики могут не потребоваться некоторые факторы рисунка 1, например факторы, связанные с дериватизацией, с градиентом (для изократических методик) и т.д.

2. Составляют таблицу контролируемых откликов и их допустимых пределов изменения. Примером является таблица 2. Выбор откликов, необходимых для исследования робастности методик, зависит от их типа (таблица 3).

3. Составляют шаблон таблицы оценки рисков для определенных факторов из диаграммы Исикавы. При этом, как правило, достаточно рассматривать только факторы, связанные с хроматографической системой, и не рассматривать факторы, связанные с пробоподготовкой (пояснение дано ниже). Можно также не рассматривать те из факторов, связанных с хроматографической системой, влияние которых на отклики должно исследоваться при разработке методики (таблица 1).

Шаблон для оценки рисков факторов конкретной методики может иметь следующий вид. Первый столбец – **«Факторы»** (или «Факторы: уровни факторов» – для метода «one-factor-at-a-time»); второй столбец – **«Отклики»** (контролируемые отклики, за исключением тех, которые связаны с нормированием содержания основных веществ и примесей; таблица 2); третий, четвертый и пятый столбцы – соответственно **«Критичность», «Вероятность» и «Риск»** в баллах (или «высокий», «средний», «низкий»); шестой столбец – **«Обоснование»** (обоснование возможного негативного влияния фактора на отклик). Желательно иметь еще и седьмой столбец – **«Хроматографируемые растворы»** (растворы, которые необходимо хроматографировать при исследовании робастности методики), который важен для понимания того, какие

[1] Не учитываются такие факторы, как качество реактивов; объем инжектора; объем раствора, отбрасываемый в начале фильтрования.

Таблица 3.

Отклики, контролируемые при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ в зависимости от типа методики (общий случай)

№	Отклик	Примеси	Количественное определение	Однородность содержания	Растворение
1.	Число теоретических тарелок	Да	Да	Да	Да
2.	Фактор асимметрии пика основного вещества	Да	Да	Да	Да
3.	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	Да	Нет/Да*	Нет/Да*	Нет/Да*
4.	Разрешение между двумя другими обсчитываемыми пиками (не указанными в System Suitability), которые наиболее сильно перекрываются, а если таких нет, то между наиболее близко расположенными пиками на хроматограмме испытуемого раствора.	Да	Нет	Нет	Нет
5.	Относительное стандартное отклонение	Да	Да	Да	Да
6.	Отношение «сигнал – шум» S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы	Да	Нет	Нет	Нет
7.	Время удерживания основного вещества при изократическом режиме	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*
8.	Время удерживания основного вещества при градиентном режиме	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*	Да/Нет*
9.	Относительные времена удерживания, указанные в методике	Да	Нет	Нет	Нет
10.	Спектральная чистота пика	Да	Нет	Нет	Нет
11.	Содержание основного вещества	Нет	Да	Да	Да
12.	Содержание идентифицированной примеси	Да	Нет	Нет	Нет
13.	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	Да	Нет	Нет	Нет
14.	Сумма примесей	Да	Нет	Нет	Нет

Примечание: * Да – если значение отклика регламентируется в валидируемой методике; Нет/Да – чаще «Нет», Да/Нет – чаще «Да».

из растворов можно не хроматографировать и тем самым сократить объем работ при исследовании робастности методики.

В качестве шаблона для оценки рисков факторов можно использовать также шаблон, получаемый из таблицы 1, если удалить из нее данные, приведенные в столбцах 3–6. Однако такой шаблон больше подходит для рассмотрения обобщенной оценки рисков в связи с исследованием робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ и менее информативен для конкретных методик.

Примечание. Причину того, что при валидации методик ВЭЖХ/УЭЖХ робастность исследуют, как правило, только по отношению к факторам, связанным с хроматографической системой, можно объяснить следующим образом. В случае неробастности методики относительно факторов, связанных с пробоподготовкой, неизбежно потребуется доработка методики и ее повторная валидация. Поэтому исследование робастности методики по отношению к «факторам пробоподготовки» лучше проводить как можно раньше – на стадии разработки методики. Напротив, неробастность методики по отношению к большинству факторов, связанных с хроматографической системой, обычно может быть устранена в ходе валидации методики за счет коррекции требований к пригодности хроматографической системы, введения специальных ограничений в условия хроматографирования [4] и/или в описание методики.

4. Проводят оценку рисков, заполняя при этом шаблон таблицы оценки рисков. Основная задача таблицы оценки рисков – оценить **риски**, связанные с тем, что при тестировании робастности методики не будет исследовано влияние каких-то факторов, потенциально способных критически повлиять на отклики (те выйдут за допустимые пределы).

Известно, что для оценки риска применяют различные методы [5, 10, 11], причем наибольшее распространение получил FMECA (Failure Mode Effect Criticality Analysis – анализ характера, последствий и критичности отказов) [10]. Для прогноза риска методом FMECA часто используют такие показатели, как *«Критичность»* (тяжесть «вреда») и *«Вероятность»* (вероятность негативного влияния фактора), а также *«Выявляемость»*. Последний показатель характеризует возможность обнаружения нежелательных событий; он важен для оценки рисков, связанных с контролем стадий/операций различных процессов: чем выше выявляемость нежелательных событий, тем ниже риск того, что нежелательное событие не будет обнаружено при контроле процесса. При исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, как правило, выявляемость нежелательных событий всегда высокая (легко обнаруживается недопустимое отклонение

откликов от регламентируемых/нормируемых значений, указанных в требованиях к пригодности хроматографической системы, в спецификации и т.д.). Поэтому при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ для оценки риска и выбора значимых факторов достаточно использовать только показатели «Критичность» и «Вероятность», а риск оценивать по формуле **«Риск = Критичность х Вероятность»**. При этом «Критичность» фактора определяется степенью его влияния на контролируемые отклики, а «Вероятность» – вероятностью того, что фактор может повлиять на какой-то из контролируемых откликов столь сильно, что отклик выйдет за допустимый предел. Предлагаемый способ оценки риска при исследовании робастности методик формально похож на анализ риска методом FMEA [10, 11], однако в FMEA не рассматривается критичность отказов.

На рисунке 2 представлена таблица для оценки критичности факторов и вероятности критического воздействия факторов на отклики. Там же приведена простая и тем не менее достаточно эффективная матрица для оценки риска по формуле «Риск = Критичность х Вероятность». Красным ячейкам соответствует высокий риск, желтым – средний риск и зеленым – низкий риск. Отметим два важных момента. Во-первых, то, что таблицу и матрицу на рисунке 2 можно применять для оценки риска при исследовании робастности любых хроматографических методик; во-вторых, для более дифференциальной оценки риска можно было бы использовать не матрицу 3х3, как на рисунке 2, а, например, 3х5 (3 – для «Критичности») или 5х5. Однако для этого пока недостаточно статистической информации по влиянию факторов на контролируемые отклики.

В таблице 1 приведены результаты обобщенной оценки рисков в связи с исследованием робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Результаты оценки рисков факторов, представленных в таблице 1, можно использовать для любых методик ВЭЖХ/УЭЖХ как «наихудший случай». В то же время следует иметь в виду, что при оценке риска для конкретных методик риск для некоторых факторов, в отличие от таблицы 1, может оказаться низким, что дает возможность исключить такие факторы из исследования робастности и снизить затраты при валидации методики. Например, в случае методик определения содержания основных веществ или методик определения примесей методом изократической ВЭЖХ/УЭЖХ фактор «Скорость потока ПФ» чаще всего будет иметь низкий риск.

Важно подчеркнуть, что исключение любого фактора, связанного с хроматографической системой, из исследования робастности при валидации конкретной методики должно быть надежно обосновано с привлечением анализа рисков, включающего рассмотрение особенностей хроматограмм и теоретических аргументов (рисунок 2).

При оценке риска следует учитывать риски, связанные с трансфером методики и ее использованием при разовом внешнем контроле продукции. Поэтому для методик определения примесей не следует пренебрегать исследованием влияния разных серий сорбента, так как подавляющее большинство сорбентов производится сравнительно небольшими сериями. Надо также учитывать возможность использования методики не только на том хроматографе, который указан в методике, но и на однотипных хроматографах (близких по характеристикам), в том числе других производителей. В связи с этим при валидации методики не следует пренебрегать проверкой робастности методики на двух однотипных хроматографах, желательно разных производителей, если такая проверка не проведена при разработке методики.



КРИТИЧНОСТЬ	ВЕРОЯТНОСТЬ
ВЫСОКАЯ (3) – если изменение фактора может вызвать выход хотя бы одного из контролируемых откликов за допустимые пределы.	**ВЫСОКАЯ (3)** – если на основании хроматограмм, полученных при разработке методики и валидации ее специфичности, и теоретических аргументов можно сделать вывод о том, что фактор с высокой вероятностью может вызвать такое изменение хотя бы одного контролируемого отклика, что отклик выйдет за допустимые пределы.*
НИЗКАЯ (1) – если изменение фактора не может оказать влияния ни на один из контролируемых откликов.	**НИЗКАЯ (1)** – если на основании хроматограмм, полученных при разработке методики и валидации ее специфичности, и теоретических аргументов можно сделать надежно обоснованный вывод о низкой вероятности того, что фактор сможет вызвать такое изменение хотя бы одного контролируемого отклика, что отклик выйдет за допустимые пределы.*
СРЕДНЯЯ (2) – если нет надежных оснований для оценки критичности фактора ни как высокой, ни как низкой.	**СРЕДНЯЯ (2)** – если нет надежных оснований для оценки вероятности ни как высокой, ни как низкой.

Примечание: *Валидация специфичности методики должна включать стрессовые эксперименты [18]. К теоретическим аргументам относятся известные из теории закономерности влияния факторов на время выхода, высоту, ширину и асимметрию пиков; на их смещение в сторону начала или конца хроматограммы, а также наличие или отсутствие на хроматограммах близко расположенных пиков; близость или удаленность отношения S/N (сигнал/шум базовой линии) от минимально допустимого значения S/N и т.д.

Рисунок 2. Матрица и таблица для оценки риска, связанного с тем, что влияние фактора не будет исследовано при оценке робастности методики. Красные ячейки – высокий риск, желтые – средний риск, зеленые – низкий риск

5. Составляют таблицу факторов высокого и среднего риска и пределы их изменения. В ней для каждого фактора указывают название фактора и его обозначение, номинальное значение по методике, единицу измерения, пределы изменения в %, а также фактические значения на нижнем (–1) и на верхнем (+1) пределах [4, с. 192]. Для качественных факторов, например для хроматографической колонки, значение, соответствующее (+1), присваивают колонке с одной серией сорбента, а (–1) – колонке с другой серией такого же сорбента.

Нередко трудность вызывает обоснованный выбор пределов изменения факторов. В связи с этим можно воспользоваться данными из таблицы 4: в ней приведены ориентировочные значения пределов изменения для факторов, которые часто имеют высокий и средний уровень риска.

6. Составляют матрицу планирования экспериментов (Experimental design matrix). В этой матрице первый столбец содержит номера экспериментов, следующие столбцы – наименования факторов (заглавие столбцов) и их уровни (+1; –1) или фактические значения. Такое построение матрицы планирования экспериментов удобно, так как каждая строка в ней – это определенные условия хроматографирования.

Особенностью матрицы метода «one-factor-at-a-time» является то, что в любой строке может находиться только один из факторов на уровне, отличном от номинального. Напротив, при использовании метода DOE в любой строке матрицы должна находиться комбинация уровней всех рассматриваемых факторов; кроме того, в матрицу DOE часто включают **фиктивные факторы** (dummy factors) для оценки статистической значимости влияния факторов на отклики.

Таблица 4.

Факторы высокого и среднего риска из таблицы 1, связанные с хроматографической системой, и ориентировочные значения пределов изменения этих факторов

№	Факторы (X)	Единица измерения	Ориентировочные значения пределов изменения фактора
1.	Содержание более сильного элюента/ элюентов в подвижной фазе (ПФ) при изократическом элюировании	% (об)	±5% относительных (отн.) – типичное значение; минимальное значение: ±2% (отн.) – для бинарных ПФ, получаемых с использованием мерной посуды; ±1% (отн.) – при приготовлении ПФ путем взвешивания компонентов или при прямом смешении в хроматографе ПФ, приготовление которых не требует использования мерной посуды. Если в ПФ имеется несколько сильных элюентов и для приготовления ПФ используется мерная посуда, то следует рассматривать «наихудшие случаи» (см. текст).
2.	Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{min}	%	То же.
3.	Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{max}	%	То же.
4.	Содержание ион-парного реагента в ПФ	мг/л	Такие же числа, но в абсолютных процентах.
5.	Содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп	мл/л	Такие же числа, но в абсолютных процентах.
6.	Значение pH буфера	pH	±0,2 pH [13] – типичное значение.
7.	Скорость потока ПФ	мл/мин	±10% [4] – типичное значение.
8.	Длина волны 1	нм	±2 нм [13] – типичное значение.
9.	Колонка	-	Колонка, содержащая такой же сорбент, но другой серии.
10.	Концентрация соли в буфере или ионная сила буфера	мг/мл	±10% [13].
11.	Градиент: длина изократического участка (кроме стадии уравновешивания колонки)	мин	±1%.
12.	Температура колонки	°C	±3 °C [4] – типичное значение; ±2 °C – минимальное значение.
13.	Температура образца (для термолабильных веществ)	°C	±3 °C – типичное значение; ±2 °C – минимальное значение.
14.	Хроматограф	–	Однотипный хроматограф, желательно другого производителя.

Примечанин: [1]Влияние фактора «длина волны» на робастность методики исследуют только для методик определения примесей.
Примечание: ориентировочные значения пределов изменения факторов, связанных с пробоподготовкой, приведены в [24, p. 455].

7. Проводят эксперименты в соответствии с матрицей планирования экспериментов; оценивают робастность методики и при необходимости корректируют допустимые пределы изменения откликов и/или пределы изменения факторов. При условиях хроматографирования, задаваемых строками матрицы планирования экспериментов, хроматографируют растворы в последовательности, указанной в методике, робастность которой оценивают. Дальнейшая оценка робастности методики зависит от используемого метода исследования робастности методики.

В случае применения метода «one-factor-at-a-time» действия простые. Для каждого фактора на нижнем и на верхнем пределе/уровне проверяют, находятся ли экспериментально полученные значения откликов в допустимых пределах. Если нет, то рассматривают возможность скорректировать допустимые пределы изменения откликов и/или пределы изменения фактора таким образом, чтобы контролируемые отклики не выходили за их скорректированные/допустимые пределы.

При применении метода DOE действия более сложные и требуется компьютерная программа для обсчета экспериментальных данных, например в соответствии с формулами, приведенными в [6]. Определяют значимые (потенциально критические) факторы с помощью специальных процедур, основанных на математической статистике. Для каждого значимого фактора вычисляют скорректированные пределы его изменения. Устанавливают «наихудшие случаи» для откликов – определенные комбинации предельных и номинальных значений факторов, проводят при этих комбинациях факторов эксперименты и вычисляют скорректированные допустимые пределы изменения откликов [6].

Полученные скорректированные значения допустимых пределов изменения откликов и/или пределов изменения факторов используют для уточнения и обоснования требований к пригодности хроматографической системы (ППХС). Если это возможно, то актуализируют требования ППХС; часто оказывается, что методика не требует коррекции допустимых пределов изменения откликов и в нее не надо вводить допустимые пределы изменения факторов, – во всех этих случаях делают вывод о робастности методики. В противном случае делают вывод о необходимости доработки методики.

Примечание. Для снижения риска неправильной оценки робастности методик определения примесей в новых препаратах рекомендуем для приготовления испытуемого раствора брать образец, характеризующий профиль примесей на конце срока годности препарата. Например, для приготовления испытуемого раствора использовать образец препарата или его модельную смесь, выдержанную в климатической камере при повышенной температуре в течение срока, эквивалентного заявляемому сроку годности препарата.

В матрицах планирования экспериментов каждая строка рассматривается как эксперимент [6], при этом количество строк в матрицах планирования экспериментов обычно не превышает 15 [4, 6–8]. Это может ввести в заблуждение («Всего 15 экспериментов?») и вызвать недооценку реального объема исследовательских работ. Дело в том, что строки в матрице планирования экспериментов – это разные условия хроматографирования; в соответствии с каждой строкой необходимо хроматографировать все растворы по валидируемой методике, причем некоторые растворы – до 5 повторностей. В результате этого объем работ при валидации градиентных методик определения примесей может возрасти в 1,5–2 раза! *В связи с этим надо творчески подходить к исследованию робастности методик и привлекать теоретические знания для обоснования возможности уменьшения объема исследований.* Прежде всего это касается аргументированного обоснования исключения некоторых факторов из исследования робастности методики в связи с низким риском. Для остальных факторов – высокого и среднего риска – объем исследований можно попытаться сократить путем исключения хроматографирования некоторых растворов. Например, при скорости потока ПФ на уровне (+1) можно не хроматографировать раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, достаточно указать в таблице результатов, что отношение «сигнал – шум» S/N≥10 (или иное требование по методике), как показано в таблице 6.

О ПРЕДЕЛАХ ИЗМЕНЕНИЯ ФАКТОРОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РОБАСТНОСТИ МЕТОДИК ВЭЖХ И УЭЖХ

При исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ особое внимание следует уделить пределам изменения факторов (LF; limits of the factor change): они должны обеспечивать надежность трансфера методики [4, 6]. Для установления LF теоретически можно было бы задавать LF на основании прецизионности или неопределенности значений факторов при номинальных условиях [4, с. 186; 6]. Однако при выборе LF, как правило, основываются на практическом опыте [4, 6]. В связи с этим особый интерес для исследователей робастности аналитических методик могут представлять ориентировочные значения пределов изменения факторов высокого и среднего рисков, приведенные в таблице 4.

Факторы, связаные с составом подвижной фазы. Отметим, что в таблице 4 у таких факторов, как «Содержание более сильного элюента/элюентов в ПФ (изократика)», «Градиент, начальная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или %

более сильной ПФ – B_{min}», «Градиент, конечная точка: концентрация более сильного элюента/элюентов в ПФ или % более сильной ПФ – B_{max}», пределы изменения выражены в относительных процентах, а у факторов «Содержание ион-парного реагента в ПФ» и «Содержание ТЭА или иного амина для подавления диссоциации остаточных силанольных групп» – в абсолютных процентах[1].

Пределы изменения вышеупомянутых факторов должны учитывать погрешность мерной посуды, используемой для измерения объема компонентов подвижной фазы **(ПФ)**, и точность смешения подвижных фаз в хроматографе **(ТСФ)**, в процентах. При этом предполагается, что погрешностью взвешивания можно пренебречь по сравнению с погрешностью измерения объемов. На практике суммарная погрешность мерной посуды, используемой при приготовлении ПФ, плюс ТСФ, как правило, не превышает ±5%, поэтому величину ±5% можно рассматривать как типичный предел изменения для вышеупомянутых факторов. Минимальное значение предела изменения этих факторов – ±2,0% для бинарных ПФ, получаемых с использованием мерной посуды. Оно реально достижимо на практике, учитывая, например, что у хроматографов Alliance Waters e2695 при смешении ПФ «composition accuracy» составляет 0,5% [12]. При приготовлении ПФ можно использовать не объемы, а массы компонентов. Этот способ, а также прямое смешение в хроматографе ПФ, приготовление которых не требует использования мерной посуды, может дать возможность дополнительно сузить допустимый интервал варьирования факторов до ±1% (но не меньше ТСФ).

Если в ПФ имеется несколько сильных элюентов, то нельзя ограничиваться изменением содержания только одного сильного элюента, так как каждый из них может влиять на специфичность методики. На практике неоднократно встречались случаи, когда даже при большом различии содержания сильных элюентов существенным оказывалось влияние каждого из них на времена удерживания веществ, разрешение между пиками и т.д. Поэтому если в ПФ имеется 2 и более сильных элюента, то для оценки влияния содержания элюентов на робастность методики следует рассматривать «наихудшие случаи», учитывающие влияние погрешности мерной посуды, используемой для измерения объема элюентов, а также ТСФ, если элюенты смешиваются непосредственно в хроматографе. «Наихудшими случаями» будут те, при которых: а) содержание сильных элюентов соответствует их верхнему пределу изменения, а содержание слабого элюента – нижнему пределу; уровень (+1), и наоборот: б) содержание сильных элюентов соответствует их нижнему пределу изменения, а слабого элюента – верхнему пределу; уровень (–1). Например, для ПФ ацетонитрил – метанол – буфер при приготовлении ПФ уровню (+1) будет соответствовать увеличение объема ацетонитрила и метанола (каждого) на 2% (отн.) и уменьшение объема буферного раствора на 2% (отн.) относительно их номинальных значений.

Учет погрешности мерной посуды и ТСФ может оказаться проблематичным. В таких случаях можно воспользоваться следующим простым правилом: в качестве предела изменения содержания/объема каждого элюента достаточно использовать ±2,0%. Основанием является то, что 2,0% практически всегда больше суммы погрешности мерной посуды, используемой для измерения объема элюента, и ТСФ.

Значение pH буфера. В качестве типичного значения предела изменения pH буфера при исследовании робастности методик рекомендуем ±0,2pH [13], которое встречается в подавляющем большинстве публикаций. Подчеркнем, что наименьшее значение предела изменения pH буфера, встречавшееся в литературе, составляет ±0,1pH, например [4], и это, по-видимому, связано с тем, что погрешность измерения pH может достигать ±0,03pH, а иногда и больше [14]. Если методика очень чувствительна к изменению pH и остается робастной лишь в пределах области «номинальное значение pH ± 0,2pH», то рекомендуем ужесточить требование к точности доведения pH до ±0,02pH, а также к калибровочным растворам, а именно использовать первичные калибровочные буферные растворы с декларированным значением до ±0,005 pH (например, NIST buffers [15]).

Скорость потока ПФ (F). В литературе по исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ наиболее часто используют предел изменения скорости потока $\Delta F=\pm 10\%$, например [4]. Это значение можно рассматривать как типичное. Однако $\Delta F=\pm 10\%$ не годится, если на хроматограмме испытуемого раствора имеются очень близко расположенные и тем более частично перекрывающиеся пики примесей. Неудивительно поэтому, что минимальное значение ΔF, встретившееся в литературе, составляет ±2,5% [16] и ±2,0% – при экспертизе досье на препараты.

В спецификациях на современные ВЭЖХ-хроматографы можно увидеть значения «Flow accuracy» ±1,0% или 10 µl/min (то, что больше) для широкого диапазона F [12, 17]. Фраза «…±1,0% или

[1] Поскольку термины «Элюент» и «Подвижная фаза» близки, здесь важно отметить следующее. Элюент (Eluent) – растворитель, однокомпонентный или смесь, содержащая иногда также твердые вещества (модификаторы), формирующий подвижную фазу [25]. Подвижная фаза может представлять собой как один элюент, так и смесь элюентов. Если речь идет о смешении жидкостей – потоков в хроматографе, то для обозначения потока следует использовать термин «подвижная фаза», например «Подвижная фаза А», но не «Элюент А», даже если ПФ состоит из одного элюента.

10 µl/min (то, что больше)» указывает на то, что «Flow accuracy» зависит от F, причем при F≥1,0 ml/min «Flow accuracy» находится в пределах ±1,0%, а при F<1,0 ml/min – больше, чем ±1,0%. Например, при F=0,5 ml/min «Flow accuracy» = (10 µl/min x 100)/ 500 µl/min = 2,0%. В связи с этим следует относиться с осторожностью к использованию низких значений предела изменения F, особенно к F<2,0%, из-за возможного суммирования противоположных по знаку погрешностей F между хроматографами при трансфере методики.

Длина волны (λ). В качестве предела изменения λ берут λ=±2 нм [4], основываясь на требованиях ведущих фармакопей [1, 2, 19].

Концентрация соли в буфере или ионная сила буфера. Типичное значение предела изменения этого фактора – ±10% в соответствии с [13].

Градиент: длина изократического участка (кроме стадии уравновешивания колонки). Исследование влияния длины изократических участков градиента на робастность методик целесообразно проводить только в случае, если в точке перехода от изократического участка к градиентному или от градиентного к изократическому или очень близко к этой точке имеются пики веществ, содержание которых требуется определять. При этом в качестве предела изменения этого фактора достаточно брать ±1% (так как современные хроматографы имеют очень высокую точность задания длин всех участков градиента) и указывать Dwell Volume.

Температура колонки. Типичное значение предела изменения – ±3,0 °C [4]. Аналогичное значение можно использовать и для предела изменения фактора **«Температура образца»** (для термолабильных веществ). Заметим, что, хотя производители хроматографического оборудования указывают погрешность задания температуры, как правило, не больше ±1,0 °C, предел изменения температуры колонки или образца должен быть не меньше чем ±2,0 °C. Это связано прежде всего с тем, что в термостате возможно неравномерное распределение температуры (тем более что температура, как правило, контролируется только в одной-двух точках), а также с тем, что температура ПФ в начале колонки и на выходе может зависеть от скорости потока ПФ и от температуры ПФ в резервуарах.

«Длительность уравновешивания системы» (до начала хроматографирования и в конце градиента) и «Длительность хроматографирования». Хотя при валидации методик, как правило, не исследуют влияние этих факторов, тем не менее, учитывая их чрезвычайную важность для робастности методик, считаем необходимым отметить следующее.

Перед составлением плана валидации методики обязательно следует проверить, получены ли в ходе разработки методики данные, которые, во-первых, подтверждают достаточность продолжительности уравновешивания системы перед началом хроматографирования, а также по завершении градиента; во-вторых, доказывают, что пики от предыдущей инжекции не попадают на хроматограмму последующей инжекции и не выходят между инжекциями. Если этих данных нет, то ставят вопрос о необходимости их получения в рамках разработки методики, а если это невозможно, то такие исследования включают в план валидации по показателю «робастность». В качестве предела изменения вышеупомянутых факторов целесообразно использовать +150÷200% (1,5–2 раза).

ПРИМЕР ОЦЕНКИ РОБАСТНОСТИ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ ВЭЖХ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА «ONE-FACTOR-AT-A-TIME»

В качестве примера ниже приведена оценка робастности градиентной методики ВЭЖХ для определения примесей в лекарственном препарате, вы-полненная в рамках валидации методики. Использован метод «one-factor-at-a-time». Условия хроматографирования: колонка XBridge C18, 4,6x150 мм, 5 мкм; подвижная фаза (ПФ) А: кислота – тетрагидрофуран – вода (4:30:1000); подвижная фаза В: муравьиная кислота – тетрагидрофуран – метанол (4:30:1000); скорость потока F=1 мл/мин; объем пробы 10 мкл; хроматограф Waters Alliance 2695: детектор PDA, 254 нм; температура колонки 30°C; градиент: 0 мин (A:B=90%:10%); 40 мин (A:B=0%:100%); 41 мин (A:B=90%:10%); 50 мин (A:B=90%:10%). Риск, связанный с исключением фактора из исследования робастности методики, оценивали по формуле **«Риск = Критичность x Вероятность»** (рисунок 2). В таблице 5 приведены факторы высокого и среднего риска, использованные для исследования робастности рассматриваемой методики, а также пределы изменения этих факторов. Отметим, что риски, связанные с варьированием температуры колонки и образца, в пределах ±3 °C были оценены как низкие; кроме того, не исследовали влияние B_{max}, так как по методике B_{max}=100%.

Последовательно изменяли один из факторов (таблица 5) при постоянстве других факторов; при этом каждый фактор брали сначала на одном уровне, затем на другом. Хроматографировали бланк, раствор для определения чувствительности хроматографической системы (ПЧХС), раствор сравнения, раствор для проверки пригодности хроматографической системы и испытуемый раствор. Определяли контролируемые отклики. Полученные результаты представлены в таблице 6. Из таблицы 6 видно, что все контролируемые отклики не выходят за допустимые пределы изменения, задаваемые условиями ≥ или ≤, или ±Δ, %. Поэтому можно сделать заключение о робастности методики.

Таблица 5.

Факторы высокого и среднего риска, потенциально способные влиять на робастность методики определения примесей в лекарственном препарате, и их пределы изменения

№	Факторы	Единица измерения	Значение по методике	Пределы изменения	Уровень –1	Уровень +1
1.	Скорость потока (F)	мл/мин	1,0	±10%	0,9	1,1
2.	Градиент: начальная концентрация более сильной подвижной фазы (B_{min})	%	10,0	±2% отн.	9,8	10,2
3.	Градиент: конечная концентрация более сильной ПФ (B_{max})	%	100	±2% отн.	98	–
4.	Длина волны (λ)	нм	254	±2нм	252	256
5.	Колонка*	–	–	–	Колонка 1	Колонка 2

Примечание: * Хроматографическая колонка 2 содержит такой же сорбент, что и колонка 1, но другой серии.

Таблица 6.

Экспериментальные результаты определения откликов при номинальных (по методике) и при предельных значениях факторов

Факторы (X) / Отклики (Y)	Пределы изменения откликов	Результат по методике	F (–10%)	F (+10%)	Bmin (–2%)	Bmin (+2%)	Bmax (–2%)	λ (–2 нм)	λ (+2 нм)	Другая серия сорбента
Эффективность хроматографической колонки (N)	≥10000 т.т.	122809	136288	115966	108559	112002	107717	129130	125813	118978
Фактор асимметрии ($T_{0,05}$) пика лекарственного вещества (ЛВ) на хроматограмме раствора сравнения	≤1,5	1,06	1,05	1,05	1,02	1,07	1,04	1,03	1,04	1,02
Разрешение (Rs) между пиками ЛВ и примеси с RRT около 1,15	≥2,0	5,77	5,70	5,91	5,75	5,58	5,72	5,75	5,73	6,13
Относительное стандартное отклонение площади пика ЛВ (RSD)	≤5,0 %	1,53	0,32	1,52	1,05	0,77	0,21	1,16	0,41	0,39
Отношение «сигнал – шум» S/N	≥10	31	29	(≥10)	37	41	29	32	24	50
Содержание примеси с RRT около 1,15	Δ=±50%	0,03%	0,02% Δ=–33,3%	0,02% Δ=–33,3%	0,03% Δ=0,0%	0,03% Δ=0,0%	0,04% Δ=33,3%	0,03% Δ=0,0%	0,03% Δ=0,0%	0,02% Δ=–33,3%
Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	Δ=±50%	0,08%	0,07% Δ=–12,5%	0,07% Δ=–12,5%	0,08% Δ=0,0%	0,08% Δ=0,0%	0,08% Δ=0,0%	0,07% Δ=–12,5%	0,07% Δ=–12,5%	0,07% Δ=–12,5%
Сумма примесей	Δ=±25%	0,11%	0,09% Δ=–18,2%	0,09% Δ=–18,2%	0,11% Δ=0,0%	0,11% Δ=0,0%	0,12% Δ=9,1%	0,10% Δ=–9,1%	0,10% Δ=–9,1%	0,09% Δ=–18,2%
Время удерживания основного вещества	Δ=±15%	16,936 мин	17,635 Δ=+4,1%	16,267 Δ=–4,0%	17,039 Δ=+0,6%	16,835 Δ=–0,6%	17,225 Δ=+1,7%	16,936 Δ=0,0%	16,936 Δ=0,0%	16,311 Δ=–3,7%
Относительное время удерживания (RRT) идентифицированной примеси	Δ=±15%	0,33	0,35 Δ=6,1%	0,32 Δ=–3,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%	0,34 Δ=3,0%	0,33 Δ=0,0%
Спектральная чистота пика ЛВ	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый	Пик чистый

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к исследованию робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ, включающий анализ рисков. Он дает возможность более надежно обосновывать как выбор, так и исключение определенных факторов при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ. Проведена обобщенная оценка рисков, связанных с тем, что при тестировании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ не будет исследовано влияние некоторых факторов, потенциально способных влиять на результаты анализов. Подчеркнуто, что робастность методик необходимо исследовать по отношению ко всем факторам высокого и среднего риска.

Уровень риска факторов зависит от конкретной методики и определяется с использованием специальной матрицы и таблицы для оценки критичности фактора и вероятности его критического воздействия на отклики. Для факторов, часто имеющих высокий и средний уровень риска, приведены ориентировочные значения пределов изменения. Даны также ориентировочные значения допустимых пределов изменения откликов, которые необходимо контролировать при исследовании робастности методик ВЭЖХ/УЭЖХ.

Приведен пример исследования робастности при валидации градиентной методики ВЭЖХ для определения примесей с помощью анализа рисков и метода «one-factor-at-a-time».

ЛИТЕРАТУРА

1. United States Pharmacopoeia. USP40–NF35. 2017.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. 1. – М. 2015.
3. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – ICH. 2005.
4. Й. Эрмер., Д.Х. Мак, Б. Миллер. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с. // Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice / Ed. by J. Remer, J.H. Mac, B. Miller. – Wenham: Wiley-VT Verlag GmbH & Co. Ka, 2005. 403 p.
5. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Quality risk management. Q9. – ICH. 2005.
6. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke et al. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2001. V. 24, № 5-6. P. 723–753.
7. E. Hund, Y. Vander Heyden, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Derivation of system suitability test limits from a robustness test on an LC assay with complex antibiotic samples // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2002. V. 30. P. 1197-1206.
8. B. Dejaegher, Y. Vander Heyden. Ruggedness and robustness testing // J. Chromatography A. 2007. V. 1158. P. 138–157.
9. E. Hund, Y. Vander Heyden, M. Haustein et al. Comparison of several criteria to decide on the significance of effects in a robustness test with an asymmetrical factorial design // Analytica Chimica Acta. 2000. V. 404. P. 257–271.
10. ГОСТ Р 51901.12-2007 (МЭК 60812:2006). Менеджмент риска. Метод анализа видов и последствий отказов. – М.: Стандартинформ, 2008 (IEC 60812:2066. Analysis techniques for system reliability – Procedure for failure mode and effects analysis (FMEA) (MOD)). URL: http://www.novsu.ru/file/1202523 (дата обращения 10.12.2017).
11. ГОСТ Р ИСО/МЭК 31010-2011. Методы оценки рисков. – М.: Стандартинформ, 2008 (ISO/IEC 31010:2009. Risk management – Risk assessment techniques. (IDT)). URL: http://ivan-shamaev.ru/wp-content/uploads/2013/05/31010-2011_Russia.pdf (дата обращения 10.12.2017).
12. Waters e2695 Separations Modules. – Waters. 2008. URL: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002552en.pdf (дата обращения 10.12.2017).
13. European Pharmacopoeia, 9th ed. Chapter 2.2.46. Chromatographic separation techniques. 2017.
14. J.A. Illingworth. A common source of error in pH measurement // Biochem. J. 1981. V. 195. P. 259–262.
15. Application Bulletin 188/3 e pH measurement technique. Metrohm. URL: http://www.mep.net.au/wpmep/wp-content/uploads/2014/06/MEP_693384_AB-188_3_EN.pdf (дата обращения 10.12.2017).
16. B. Patel, S. Roy, H. Ghelani, S. Parmar. Development & Validation of RP-HPLC Method for Estimation of Dabigatran Etexilate Mesylate from Capsule Dosage Form // Intern. J. Pharma Sciences and Research. 2017. V. 8. № 6. P. 142–151.
17. Agilent 1200 Series Specification.- Agilent Technologies. 2006. URL: http://photos.labwrench.com/equipmentManuals/6933-2432.pdf (дата обращения 10.12.2017).
18. Н.А. Эпштейн. О стрессовых экспериментах при разработке / усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т. 3. № 16. С. 54–68.
19. Н.А. Эпштейн. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы // Ведомости НЦЭСМП. 2017. Т. 7. № 2. С. 85–91.
20. V. Kalyana Chakravarthy, G. Kishore Babu, R. Lakshmana Dasu et al. The role of relative response factor in related substances method development by high performance liquid chromatography (HPLC) // Rasayan J. Chem. 2011. V. 4. № 4. P. 919–943. URL: http://www.rasayanjournal.co.in/vol-4/issue-4/37.pdf (дата обращения 10.12.2017).
21. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th Ed. EDQM. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30–32. URL: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf (дата обращения 10.12.2017).
22. А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. 2004. № 3. С. 1–15.
23. А.И. Гризодуб. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. – Харьков: Украинский научный фармакопейный центр контроля качества лекарственных средств, 2016. С. 47.
24. M.I. Jimidar, P. Heylen, M. De Smet. Method Validation // Separation Science and Technology. 2007. V. 8. P. 441–458.
25. П.С. Садек. Как избежать ошибок в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Лабораторное пособие / Пер. с англ. И. Дубинского. – М. 2010. (Перевод книги Paul C. Sadek. Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual, John Wiley & Sons, Ltd. 1999).

УДК 547.398 + 547.583

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЗАМЕЩЕННЫХ АМИДОВ ФТАЛЕВЫХ КИСЛОТ

Н.В. Колотова[1]*, А.В Старкова[1]

Резюме. Исследована антигельминтная, инсектицидная активность, а также влияние на гемостаз монозамещенных амидов фталевых кислот. Инсектицидная, антигельминтная активность для исследованных монозамещенных амидов фталевой и тетрахлорфталевой кислот не обнаружена. Для амидов тетрахлорфталевой кислоты характерно гемостатическое действие. Гемостатический эффект одного соединения в 1,5 раза превышает действие этамзилата.

Ключевые слова: амиды фталевых кислот, антигельминтная активность, инсектицидная активность, антикоагулянтная активность, гемостатическая активность.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONOSUBSTITUTED AMIDES OF PHTALIC ACIDS

N.V. Kolotova[1]*, A.V. Starkova[1]

Abstract. Anthelmintic, insecticidal, anticoagulant, hemostatic activities of monosubstituted amides of phthalic acid were investigated. Insecticidal, anthelmintic and antico-agulant activities for investigated monosubstituted amides of phthalic and tetrachlorophthalic acids were not discovered. Amides of tetrachlorophthalic acid are characterized by a hemostatic effect. Hemostatic effect of one compound in 1.5 times exceeds the effect of Etamsylate.

Keywords: amides of phthalic acid, anthelmintic, insecticidal activity, anticoagulant activity, hemostatic activity.

1 – ФГБУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: kolotova.nina49@mail.ru
Тел.: 8 (342) 282 58 56

ВВЕДЕНИЕ

Ранее у ряда монозамещенных амидов фталевых кислот мы обнаружили инсектицидное (противокомариное), антигельминтное, антикоагулянтное и гемостатическое действие, сравнимое с активностью применяемых в медицине и сельском хозяйстве препаратов [1–3]. Поиск соединений с высоким уровнем этих видов активности является актуальным, поскольку многие лекарственные средства имеют нежелательные побочные действия, а также часто наблюдается привыкание к применяемым препаратам при их продолжительном использовании [4–7].

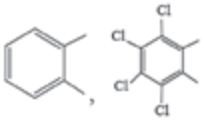
В настоящей работе мы продолжаем скрининг монозамещенных амидов фталевых кислот с целью поиска соединений с этими видами активности и установления в дальнейшем зависимости «структура – биологическое действие».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

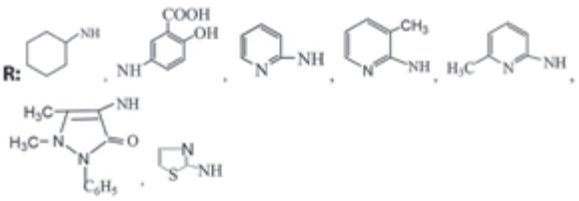
В качестве объектов исследования биологической активности были взяты алициклический, ароматический и гетероциклические амиды фталевой и тетрахлорфталевой кислот общей формулы:

RCO**X**-**Y**COOH

где **X-Y**:



R:



Инсектицидная (противокомариная) активность соединений изучалась на личинках комаров Chironomidae (мотыль), которые были приобретены в зоомагазине г. Перми в 2017 году. В чашку Петри помещали 5 мл 0,1% водного раствора исследуемых соединений, синтезированных на кафедре аналитической химии ПГФА, и погружали 5 личинок комаров. Эффект действия соединений определялся временем наступления смерти. В качестве эталонов использовали применяемые в качестве инсектицидных средств имидаклоприд (танрек), диазинон и пиримифос, приобретенные в специализированных магазинах г. Перми.

Исследование антигельминтной активности соединений проводили на дождевых червях (приобретены в зоомагазине г. Перми в 2017 году) по методике М.П. Николаева [8]. В чашку Петри помещали 5 мл 0,5% водного раствора исследуемых соединений и погружали 5 особей червей длиной 5–8 см и диаметром 3–5 мм. Далее фиксировали время наступления смерти каждой особи по прекращению двигательной активности в ответ на механическое раздражение. Продолжительность жизни червей в контроле: в очищенной воде составляет сутки. В качестве эталонов применяли противогельминтные препараты «Пирантел» (ООО «Озон», Россия) и «Левамизол» (Gedeon Richter, Венгрия) с действующим сроком годности, приобретенные в аптечной сети. Результаты исследования антигельминтной и инсектицидной активности соединений обработаны способом вариационной статистики по методу Фишера – Стьюдента с помощью программы статистической обработки Stat Base ver.2.5.4 (StatSoft, Россия) [9].

Изучение влияния соединений на гемостаз проводили на коагулометре «АПГ4-02-П» производства ООО «ЭМКО» г. Москва. Для исследования использовали цитратную (3,8%) кровь (9:1) кроликов. Животные содержались на стандартном пищевом режиме в условиях вивария ПГФА в соответствии с СанПиН № 1045-73 и требованиями Фармкомитета РФ к проведению доклинических испытаний, изложенных в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [10], а также с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.). В качестве эталонов использовали «Гепарин» («Биосинтез», Россия) и «Этамзилат» («Биосинтез», Россия), приобретенные в аптечной сети, с действующим сроком годности. Для определения активности в кювету помещали 50 мкл крови и добавляли 50 мкл 0,2% раствора исследуемого соединения, для контроля вместо вещества добавляли 50 мкл изотонического раствора хлорида натрия с действующим сроком годности, приобретенного в аптечной сети. В качестве препарата сравнения добавляли 50 мкл гепарина в концентрации 1 ЕД/мл крови или 50 мкл раствора этамзилата в концентрации 0,2%. Затем пробы инкубировали в течение 60 с. Добавляли 50 мкл 1% раствора хлорида кальция, производитель (ООО «Технология – Стандарт», г. Барнаул) во флаконах по 5 мл (сер. 602035, годен до 02.2018 г.) и приступали к измерению времени свертывания крови.

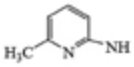
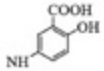
Степень влияния соединений на гемостаз определяли по изменению времени свертывания цитратной крови в контроле и опыте и статистически обрабатывали с использованием коэффициента Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены данные исследования инсектицидной активности для двух амидов фталевой и двух амидов тетрахлорфталевой кислот. Ранее было установлено, что 3-метил-2-пиридиламид фталевой кислоты обладает инсектицидным действием, близким к активности диазинона [1]. В данном исследовании мы установили, что отсутствие метильной группы (соединение 1) или перенос ее в положение 6 (соединение 2) пиридинового фрагмента для 2-пиридиламидов фталевой кислоты приводит к потере инсектицидного действия. Ранее среди амидов тетрахлорфталевой кислоты было обнаружено соединение, инсектицидная активность которого выше активности диазинона [1]. Исследованные 3-карбокси-4-гидроксифениламид и 2-тиазолиламид тетрахлорфталевой кислоты (соединения 3 и 4) противокомариным эффектом не обладают.

Таблица 1.

Инсектицидная активность соединений

n\n	X-Y	R	Продолжительность жизни личинок (опыт), мин	Продолжительность жизни личинок (контроль), сутки
1.			более 200	1
2.			более 200	1
3.			более 200	1
4.			более 200	1
Эталоны		Диазинон	17,0±1,87	1
		Пиримифос	24,5±1,69	1
		Имидаклоприд	43,5±3,39	1

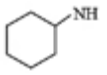
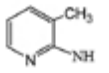
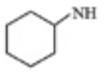
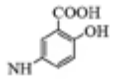
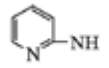
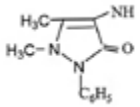
Результаты исследования антигельминтной активности приведены в таблице 2. Известно, что антигельминтная активность 6-метил-2-пиридиламида тетрахлорфталевой кислоты почти в 2 раза превышает действие пирантела [2]. 2-пиридиламиды тетрахлорфталевой и фталевой кислот (соединения 6 и 2), не содержащие в положении 6 метильной группы, а также 3-метил-2-пиридиламид фталевой кислоты (соединение 3) не обладают антигельминтной активностью. Циклогексиламиды фталевой и тетрахлорфталевой кислот (соединения 1 и 4), 3-карбокси-4-гидроксифениламид и антипириламид тетрахлорфталевой кислоты (соединения 5 и 6) так же неактивны.

Среди четырех исследованных амидов фталевых кислот не обнаружены соединения с прямым антикоагулянтным действием (таблица 3). Ранее обнаружено, что 2-пиридиламиды, содержащие в положениях 3, 4 и 6 метильную группу, и 4-пиридиламид фталевой кислоты обладают антикоагулянтной активностью [3].

2-пиридиламид фталевой кислоты (соединение 1) не оказывает влияния на гемостаз. Для амидов тетрахлорфталевой кислоты (соединения 2, 3 и 4) характерно гемостатическое действие. Гемостатический эффект 3-карбокси-4-гидроксифениламида тетрахлорфталевой кислоты (соединение 3) в 1,5 раза превышает активность этамзилата.

Таблица 2.

Антигельминтная активность соединений

n\n	X-Y	R	Продолжительность жизни червей (опыт), мин	Продолжительность жизни червей (контроль), сутки
1.			более 200	1
2.			более 200	1
3.			более 200	1
4.			более 200	1
5.			более 200	1
6.			более 200	1
7.			более 200	1
Эталоны		Пирантел	215,0±0,37	1
		Левамизол	20,2±2,08	1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

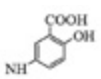
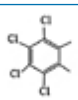
Инсектицидная, антигельминтная и антикоагулянтная активность для исследованных монозамещенных амидов фталевой и тетрахлорфталевой кислот не обнаружена. Для амидов тетрахлорфталевой кислоты характерно гемостатическое действие. Обнаружено соединение – 3-карбокси-4-гидроксифениламид тетрахлорфталевой кислоты, гемостатический эффект которого в 1,5 раза превышает активность этамзилата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова, А.В. Жованик и др. Инсектицидная активность производных янтарной и фталевых кислот // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. 2014. № 11. С. 52–55.
2. Н.В. Колотова, А.В. Старкова. Антигельминтная активность гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1(18). С. 136–138.
3. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова. Влияние на гемостаз производных фталевых кислот // Инновации в науке: сборник материалов XVI Международной заочной научно-практической конференции, 28 января 2013 г. – Новосибирск. 2013. С. 139–147.
4. В. Е. Поляков, А. Я. Лысенко Гельминтозы детей и подростков. – М.: Медицина, 2003. 256 с.
5. Р.Г. Лукшина, М. М. Локтева, Т. Н Павликовская. Паразитарные болезни человека: Монография / Под общ. ред. Р.Г. Лукшиной. 2-е изд., перераб. и доп. – Харьков: ИНЖЭК, 2005. 472 с.
6. А.П. Середа. Профилактика тромбоэмболических осложнений после эндопротезирования коленного и тазобедренного суставов. URL: travmaorto.ru/96.html (дата обращения 10.11.2017).
7. Р.М. Тихилов, Ю.М. Стойко, М.Н. Замятин и др. Профилактика тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии. Методические рекомендации / Под ред. акад. РАМН Ю.Л. Шевченко. – М. 2006. 20 с.
8. М.П. Николаев. Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии. Практическое руководство. – М.; Л.: Медгиз, 1941. 195 с.
9. В.В. Прозоровский Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. Вып. 3–4. С. 2090–2120.
10. А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

Таблица 3.

Влияние соединений на время свертывания крови

n\n	X-Y	R	Время свертывания (контроль), с	Время свертывания (опыт), с	% изменения свертываемости	P
1.			109,5±7,46	122,1±5,47	-11,5	>0,05
2.			156,9±4,74	142,2±3,19	+9,4	<0,05
3.			127,1±4,73	95,2±3,53	+25,1	<0,001
4.			137,1±3,02	125,2±3,52	+8,7	<0,05
Эталоны		Этамзилат	144,1±7,83	121,0±7,20	+16,0	<0,05
		Гепарин	145,7±9,64	618,3±55,88	-324,4	<0,001

proteinsimple
a biotechne brand

iCE3

Анализ терапевтических белков за 10 минут!

iCE3 ™ позволит Вам выйти за рамки традиционного анализа белков и ускорит сроки разработки. С момента запуска и до завершения процесса анализа пройдет не более 10 минут, что позволяет быстро оптимизировать условия. Более того, универсальный метод позволяет исследовать практически любую сложную молекулу. Такие методы, как изоэлектрофокусировка в геле, ионообменная хроматография и классическая капиллярная изоэлектрофокусировка имеют огромные преимущества, однако так же имеют свои недостатки. iCE3 сочетает в себе наилучшие качества трех методов и дает высокое разрешение, количественную оценку и автоматизацию всех процессов. Прибор существенно снижает время разработки новых методов и анализ полученных результатов, ввиду отсутствия операций, выполняемых вручную.

Система анализа белков iCE3 оборудована капиллярной колонкой, на концах которой расположены электролитические резервуары с кислотой (аналитом) и основанием (каталитом). Образец вводится до заполнения всего объёма колонки и на резервуары подаётся напряжение. Возникает градиент pH в изоэлектрических точках, разделяющих и фокусирующий молекулы в зависимости от значения pI.



С помощью ультрафиолетового детектора, встроенного в колонку, процесс контролируется в режиме реального времени. Как только разделение заканчивается, результаты анализируются и по полученным данным выстраивается диаграмма. После окончания процедуры капиллярная колонка системы анализа терапевтических белков iCE3 промывается для следующего образца. Один анализ занимает не более 15 минут. Ввод проб осуществляется микроинжектором или с помощью автосамплера Alcott 720.

Дополнительные опции

- Автосамплер Alcott 720.
- Микроинжектор PrinCE Next.
- Реактивы.

Особенности

- Компактный размер и быстрый прогон одного образца.
- Ввод пробы с помощью автосамплера. и микроинжектора.
- Капиллярная колонка промывается после проведения эксперимента.
- Анализ результатов в режиме реального времени.
- Время одного исследования 10-15 минут.

Объем образца	12-17 мкл
Подача образца	Автосамплер Alcott 720 или PrinCE Next микроинжектор
Время процесса	10-15 минут
Детекция	UV абсорбция при 280 нм
Напряжение	600 В/см
Габариты	66 см x 28 см x 31 см (ВхШхД)
Вес	20 кг
Мощность	120-230 VAC, 50/60 Гц

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-biotechnology.ru
info@phct.ru

УДК 615.21

РАЗРАБОТКА НЕИНЪЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ТЕРАПИИ

А.В. Соснов[1,2]*, Ф.М. Семченко[1], М.И. Власов[1], В.Н. Тохмахчи[1], А.А. Соснова[1], А.С. Кинзирский[2]

Резюме. На примере сильнодействующих анальгетиков обоснован алгоритм выбора соединений и лекарственных форм для разработки универсальных ЦНС-таргетных препаратов для неотложной военно-полевой и гражданской терапии. Выделены ключевые критерии и количественные параметры выбора веществ и лекарственных форм. Продемонстрированы преимущества сильнодействующих синтетических опиоидов относительно традиционно используемого морфина, его производных и аналогов. Показаны преимущества мультитаргетных препаратов. Обоснован выбор трансмукозных лекарственных форм анальгетиков, противорвотных средств и антидотов для неотложной терапии. Предложены подходы к разработке универсальной фармакологической платформы для создания ЦНС-направленных средств терапии. Описана текущая ситуация в области сильнодействующих анальгетиков и других лекарств ограниченного использования в РФ, отмечены проблемы и предложены возможные решения.

Ключевые слова: анальгетик, неотложная терапия, опиоид, коэффициент распределения, трансмукозная лекформа, мультитаргетный препарат, антидот.

DEVELOPMENT OF NON-INJECTABLE MEDICINAL DRUGS ACTING ON CNS FOR EMERGENCY THERAPY

A.V. Sosnov[1,2]*, F.M. Semchenko[1], M.I. Vlasov[1], V.N. Tohmahchi[1], A.A. Sosnova[1], A.S. Kinzirsky[2]

Abstract. Algorithm of selection of compounds and formulations for development of multi-purpose CNS targeted medicinal products for emergency field and civil therapy is justified on the example of potent analgesics. Key criteria and quantitative parameters for selection of substances and dosage forms are singled out. The advantages of strong synthetic opioids vs traditionally used morphine, its derivatives and analogues are demonstrated. Advantages of multi-target formulations are shown. Choice of transmucosal dosage forms of analgesics, antiemetics and antidotes for urgent therapy is substantiated. Approaches to development of universal pharmacological platform for creating drugs acting on CNS are proposed. The current situation in the field of potent analgesics and other limited use medicines in the Russian Federation is described, problems are noted and possible solutions are suggested.

Keywords: analgesic, emergency therapy, opioid, distribution coefficient, transmucosal dosage form, multi-target drug, antidote.

1 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), 111024, Россия, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 23

2 – ФГБУН Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный пр., д. 1

1 – Federal State Unitary Enterprise «State Pharmaceutical Plant» (FSUE «GosZMP»), 23, sh. Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

2 – Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, 1, Severny proyezd, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: andrey.sosnov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В рамках задач неотложной терапии, в том числе задач военно-полевой медицины и медицины катастроф в период отсутствия интенсивных военных конфликтов, наиболее экономически целесообразной государственной стратегией является разработка и выпуск многоцелевых фармацевтических препаратов и изделий, пригодных для гражданского использования. Термин «технологии двойного использования/назначения», как правило, используется для определения разработки, производства и использования массовой продукции как в гражданской, так и в военной области. Это прикладная разработка новой продукции многоцелевого использования или модификация имеющегося на рынке продукта. Для фармацевтики характерно именно медицинское использование, поэтому термин «двойное использование» применительно к задачам терапии, профилактики и снижения воздействия поражающих факторов использовать некорректно, поскольку использование препаратов не подразумевает деятельность, направленную на причинение вреда людям и объектам окружающей среды. Всемирная организация здравоохранения (WHO) декларирует принципы международного обмена информацией и технологиями, включая область фармакологии, с целью предупреждения и купирования последствий чрезвычайных происшествий и снижения глобальных рисков для общественного здравоохранения [1, 2]. Поэтому

более корректным представляется понятие «препараты многоцелевого использования, в том числе актуальные и для задач военной медицины и медицины катастроф».

Изделия и полупродукты многоцелевого использования в фармацевтике с точки зрения уровня и вида физиологической активности, а также принадлежности к контрольным спискам веществ ограниченного использования можно отнести к трем основным группам.

1. Коммерчески значимые фармацевтические препараты и изделия, широко применимые для гражданской и военной медицины, а также пограничной между ними области медицины катастроф. Пример: гемостатические, противоожоговые, ранозаживляющие, противорвотные, дезинфицирующие, антиинфекционные и другие средства неотложной помощи широкого спектра использования. Специфика группы – включение в государственный план закупок и резервирования для нужд обороны и безопасности.
2. Контролируемые коммерчески значимые фармацевтические препараты и изделия, включающие соединения ограниченного использования. Пример: наркотические анальгетики, анестетики, психостимуляторы, компоненты сложных антидотов и другие контролируемые средства, представляющие опасность при немедицинском использовании. Специфика группы – включение в план закупок и резервирование для нужд обороны и безопасности, а также специальные требования к производству, транспортировке и хранению.
3. Коммерчески значимые фармацевтические и ветеринарные препараты на основе сильнодействующих соединений. Могут включать как контролируемые препараты на основе психоактивных соединений, так и препараты на основе сильнодействующих веществ, не включенных в ограничительные списки. Пример: наркотические анальгетики и анестетики, некоторые антидоты, препараты на основе сильнодействующих лекарств, включая природные токсины. Дополнительная специфика группы – потенциальная возможность использования или модификации некоторых сильнодействующих компонентов в криминальных целях, включая средства поражения.

Возможность массового криминального использования компонентов сильнодействующих лекарств традиционно обсуждается в публикациях CBRN-экспертов [3, 4] скорее по аналогии с модификацией фосфорорганических пестицидов, что в конце первой половины XX века привело к разработке группы эффективных отравляющих веществ (ОВ) нервно-паралитического действия [5]. Также следует упомянуть вспомогательное военное использование гербицидов в качестве средств уничтожения растительности [6]. При этом, помимо юридических факторов [7], в некоторых публикациях не учитывается ряд принципиальных технических и экономических различий: например, (1) объем мирового производства фосфорорганических пестицидов (инсектициды и гербициды) в конце 1970-х – начале 1990-х годов XX века составлял от нескольких десятков тысяч тонн до 200 тысяч тонн в год при цене от 10 долларов США за 1 кг субстанции [8, 9], тогда как современный мировой объем производства субстанции сильнодействующего лекарства находится в интервале от нескольких килограммов (иногда до сотен граммов) до нескольких тонн в год при цене от нескольких десятков тысяч долларов США за 1 кг субстанции; (2) терапевтический индекс современных лекарственных веществ, как правило, на порядки выше индекса безопасности фосфорорганических пестицидов, производимых в эпоху их массового использования [10]; (3) в отличие от фармпрепаратов пестициды (особенно системные инсектициды) изначально разрабатывались для форм использования, схожих с применением средств химического поражения. Практически известно весьма ограниченное число сценариев использования сильнодействующих компонентов фармацевтических и ветеринарных препаратов в качестве временно выводящих средств в криминальных целях [11, 12]. Данная классификация не включает некоторые высокотоксичные диагностические контрастные средства, в том числе радиоактивные, поскольку данные препараты производятся в очень незначительных количествах под заказ и крайне дороги.

В развитых странах фармацевтика относится к области высокодоходной и высококонкурентной деятельности, соответственно любое актуальное действующее или вспомогательное соединение и технологическое решение патентуются и внедряются в практику. Проведение исследований при софинансировании из государственных средств на оборонные и защитные исследования и разработки является одной из форм стимулирования национальной конкурентоспособности [13], например программа DARPA Systems-Based Neurotechnology for Emerging Therapies (DARPA SUBNETS) [14]. При этом в случае получения коммерчески значимого результата фармацевтическая разработка используется максимально широко, поскольку экономический интерес всегда превалирует.

ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ТЕРАПИИ

Разработка новых универсальных препаратов для неотложной полевой фармакотерапии должна проводиться с учетом максимально эффективного использования потенциала сильнодействующих компонентов в составе миниатюрных (носимых) готовых форм, что требует использования высокоэффективных моно- и мультитаргетных субстанций, быстродействующих и

удобных для экстренного использования лекарственных форм, в том числе и в условиях низких температур. Использование замерзающих водных растворов невозможно, что ограничивает выбор инъекционных форм в качестве перспективных. То есть создание эффективных препаратов для неотложной полевой терапии возможно только на основе интеграции передовых научных подходов и технологий (как в области субстанций, так и лекарственных форм), а не улучшения имеющихся изделий.

Одним из современных трендов фармацевтики является полифармакология – создание новых мультитаргетных лекарственных средств и использование (расширение спектра использования) известных полифармакофорных соединений, одновременно действующих на несколько фармакологически актуальных мишеней на молекулярном уровне [15]. Это актуально как при воздействии на разные биомишени одного патологического процесса (обеспечивает синергизм действия, а в идеале потенцирование, что и является предметом данного обсуждения), так и при терапии одним лекарством (в близких эффективных дозах) различных заболеваний, например у пациентов старшего возраста, имеющих характерный набор заболеваний [16].

Мультитаргетный подход к фармакотерапии одной патологии может быть реализован как в форме создания препаратов, содержащих различные вещества в любых возможных формах, – комбинаций фиксированного состава (КФС), нековалентных и ковалентных (солекарств) конъюгатов на основе таргетных веществ [17], а также в форме полифармакофорных веществ [18]. Применимость мультитаргетных соединений зависит от сочетания факторов в рамках конкретной фармацевтической задачи. С точки зрения фармакокинетики (РК), особенно при неинъекционном введении, предпочтительно использование мультитаргетных индивидуальных соединений – солекарств с заданной стабильностью и полифармакофорных веществ, направленных на терапию конкретной патологии. Использование нековалентных конъюгатов (комплексных или супрамолекулярных соединений) с заданными параметрами, определяющими их транспортные свойствами (константа нестойкости, коэффициенты распределения и др.), позволяет создавать транспортные формы с улучшенными фармакокинетическими свойствами для известных лекарств. Использование мультитаргетных КФС, на первый взгляд, является наиболее простым подходом, но комбинация различных активных веществ в одном препарате для обеспечения синергизма *in vivo* требует подбора компонентов по многим параметрам и создания уникальной готовой формы для каждой из КФС. Сильнодействующие лекарственные вещества имеют ряд особенностей, которые хорошо изучены в рамках теории и практики таргетных воздействий, но слабо изучены с точки зрения мультитаргетного синергизма и эффективности потенцирования. В этом случае наиболее важным источником информации является опыт комплексной (мультимодальной) фармакотерапии. Использование эффекта мультитаргетного синергизма открывает уникальные возможности для создания мощных, селективных и безопасных препаратов, что крайне важно для неотложной терапии в специфических условиях вооруженных конфликтов и чрезвычайных ситуаций.

С точки зрения потенциала разнообразия лекарственных форм, соответствующих как фармацевтическим требованиям, так и требованию миниатюризации (важно при разработке новых препаратов для неотложной полевой терапии), целесообразно использовать лекарственные вещества с наиболее высокой фармакологической активностью при прочих равных условиях. Алгоритм выбора предпочтительных лекарственных форм для неотложной фармакотерапии в полевых условиях, где быстродействие – один из основных лимитирующих параметров, с учетом требований широты температурного интервала использования, удобства и безопасности введения, компактности и др. представлен на рисунке 1. Данный алгоритм можно использовать для разработки групп лекарственных средств на основе универсальной лекарственной формы, в перспективе – технологической платформы для быстродействующих и тканеспецифичных лекарств.

Например, неинъекционные лекформы, разработанные для сильно- и быстродействующих анальгетиков центрального действия, могут быть использованы для создания противорвотных препаратов, а также неинъекционных антидотов центрального действия на основе антагонистов опиатных рецепторов. Актуально создание универсальных антидотов от высокотоксичных веществ нервно-паралитического действия (ТВ НПД), особенно наиболее опасной их разновидности – ТВ НПД, сочетающих как периферические, так и центральные токсические эффекты. Поражение такими веществами приводит к выраженным калечащим эффектам, обусловленным воздействием на центральную нервную систему (ЦНС). При этом антидотная терапия и последующее лечение пострадавших крайне затруднено, поскольку имеющиеся антидоты и лекарства (разработанные для купирования и терапии поражений периферической нервной системы) не способны эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [19–23].

Разработку всех трех типов лекарственных средств (анальгетики, противорвотные и антидоты) объединяет задача обеспечения быстрой доставки активных веществ в целевые ткани ЦНС, что требует преодоления ГЭБ. Это позволяет использовать универсальную методологию и сформулировать общие фармакокинетические требования как к разработке конкретных субстанций и готовых форм, так и к универсальной фармацевтической платформе в целом. Для веществ, действующих на биомишени ЦНС в низ-

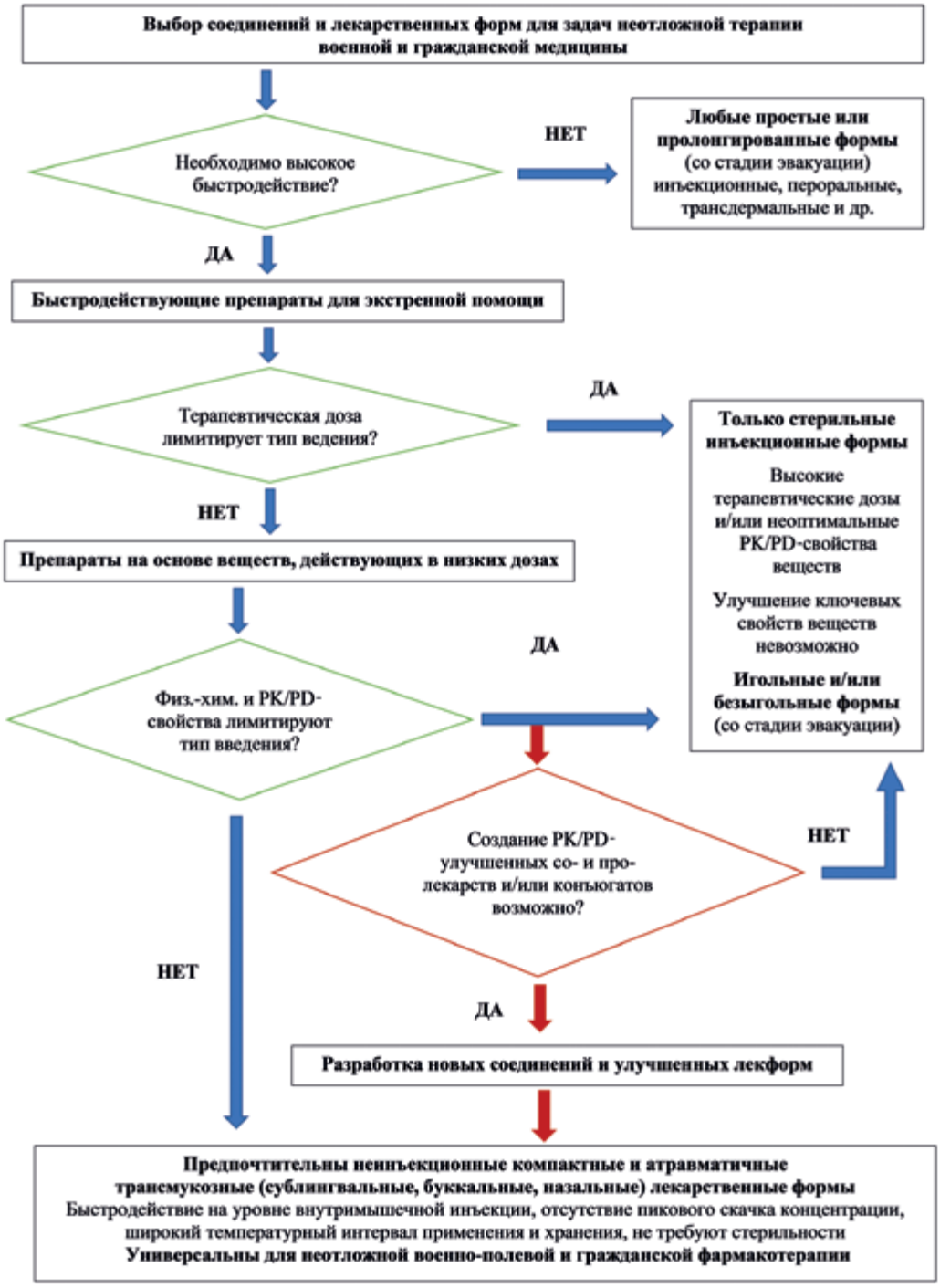


Рисунок 1. Алгоритм выбора соединений и форм введения для разработки быстродействующих препаратов, универсальных для неотложной военно-полевой и гражданской фармакотерапии. Синим выделен алгоритм разработки препаратов на основе известных соединений. Красным выделено направление создания новых соединений и форм (со- и пролекарств, нековалентных конъюгатов) с заданными свойствами

ких концентрациях, актуально создание универсальной технологической платформы для введения через слизистые оболочки, то есть разработки многофункциональных и атравматичных трансмукозных фармпрепаратов. Для создания эффективных субстанций актуален подход, включающий мультитаргетное воздействие на патологический процесс [17] и обеспечение максимально возможного быстродействия и биодоступности за счет улучшения (при необходимости) PK-свойств действующих фармакологических веществ, в том числе путем создания ковалентых и нековалентных конъюгатов. При этом быстродействие не должно сопровождаться начальным скачком концентрации в область токсических эффектов, что часто наблюдается при инъекционном (особенно внутривенном) введении.

При использовании трансмукозных форм вещество, действующее на биомишени ЦНС, должно преодолеть ряд барьеров, включая слизистую оболочку и ГЭБ. Сравнение PK-параметров показывает, что трансмукозные типы введения анальгетиков (особенно назальное и сублингвальное) близки по быстродействию к внутримышечному при подходящих значениях физико-химических свойств веществ [24]. Скорость трансмукозного проникновения вещества существенно зависит от его липофильности, определяемой величиной коэффициента распределения при значениях кислотности среды, близких к величине pH преодолеваемой слизистой оболочки, стабильности в условиях физиологической среды, нецелевого нековалентного связывания и др. Показано, что буккальная проницаемость различных лекарств наиболее точно коррелирует с коэффициентом распределения веществ, измеренным при pH 6,8, – $LogD_{6.8}$ [25].

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ И ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В PK/PD-МОДЕЛИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ НА БИОМИШЕНИ ЦНС

В статье [26] предложен наглядный анализ взаимосвязи основных PK- и фармакодинамических (PD) параметров на примере обезболивания опиоидами бупренорфином и фентанилом в тесте отдергивания хвоста. Модель, описывающая взаимосвязь между концентрацией лекарственного средства в плазме и фармакологическим эффектом (изменением времени латентного периода) как результатом действия на биомишени ЦНС, показана на рисунке 2. В этой модели распределение по биофазе характеризуется как процесс первого порядка, который лимитирует скорость в фармакодинамике *in vivo*. Разделение различных

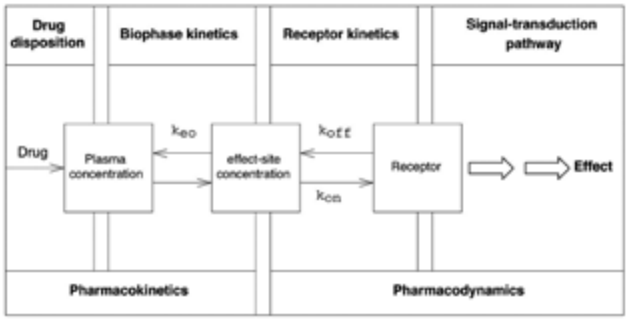


Рисунок 2. Схематичное описание действия опиоида на основе PK/PD модели [26]. Модель включает различные процессы для объяснения временных зависимостей в фармакодинамике. Фармакокинетика описывает распределение лекарственного средства в плазме и равновесное распределение в биофазе. На целевом участке лекарственное средство обратимо связывается с рецептором. При связывании с рецептором активируется каскад процессов трансдукции, что в конечном итоге приводит к фармакологическому эффекту

биологических процессов (установление биофазного равновесия, взаимодействие с рецептором и трансдукция) часто приводит к невозможности получить оценки параметров, лимитирующих скорость на стадиях процесса. Для объяснения гистерезиса на основе двух биологических процессов (PK и PD) требуется набор данных, включающий различные дозы и различные схемы введения.

Соотношения воздействия опиоида и биологического ответа *in vivo* определяются количественно с использованием модели PK/PD на основе предложенного механизма (рисунок 2). Модель описывает равновесие с биофазой, где вещество может связываться с рецептором. Распределение лекарства в области действия характеризовалось на основе модели ячейки эффектов (то есть области связывания с рецептором). Скорость изменения концентрации лекарственного средства в биофазе можно описать следующим образом:

$$\frac{d[C_e]}{dt} = k_{e0} \cdot ([C_p] - [C_e]), \quad (1)$$

где k_{e0} – константа скорости распределения первого порядка, описывающая скорость изменения концентрации лекарственного средства в ячейке эффекта, $[C_p]$ – концентрация вещества в плазме, $[C_e]$ – концентрация вещества в области связывания с рецептором.

В области действия вещество обратимо связывается с опиатным рецептором. Согласно закону действующих масс скорость связывания рецептор – лекарство ($d[C_eR]/dt$) пропорциональна концентрации лекарственного средства $[C_e]$ и концентрации свободного рецептора [R]:

$$\frac{d[C_eR]}{dt} = k_{on} \cdot [C_e] \cdot [R] - k_{off} \cdot [C_eR], \quad (2)$$

где k_{on} – константа скорости второго порядка, описывающая скорость ассоциации, а k_{off} – константа скорости первого порядка, описывающая скорость диссоциации комплекса рецептор – лекарство.

Константы k_{on} (мл/нг/мин) и k_{off} ($мин^{-1}$) являются фармакодинамическими характеристиками связывания конкретного действующего вещества и конкретной биомишени и (при прочих равных условиях) не могут быть изменены за счет модификации транспортной формы лекарства, способа введения и т.д. В случае веществ центрального действия константа скорости распределения k_{e0} ($мин^{-1}$) характеризует время установления равновесия между концентрацией вещества в целевых тканях ЦНС и концентрацией вещества в крови (плазме).

Время полупериода установления равновесия между концентрациями лекарства в крови и в целевой ткани ЦНС – $t_{1/2}k_{e0}$ (мин) – является экспериментальной характеристикой вещества [27] и зависит от его липофильности при физиологическом значении pH

и других физико-химических свойств [28]. Параметр $t_{1/2}k_{e0}$ (наряду с T_{max}) характеризует быстродействие *in vivo* в случае инъекционного введения веществ с высокой аффинностью и высокой скоростью связывания с биомишенью, то есть сильнодействующих лекарств. Используется в основном для сравнения опиоидных анальгетиков, поскольку именно скорость транспорта из кровотока в ткани ЦНС является фактором, лимитирующим быстродействие при введении мощных анальгетиков-опиоидов. При отсутствии активации проникновения, то есть в модели пассивной диффузии, величина $t_{1/2}k_{e0}$ зависит от величины коэффициента распределения, определяемой липофильностью вещества. Параметр используется для сравнительной оценки распределения и скорости транспорта веществ через ГЭБ и может характеризовать быстродействие соединений для неотложной терапии. В рамках предлагаемого алгоритма (рисунок 1) данный параметр (наряду с T_{max}) используется при отборе веществ – кандидатов для разработки быстродействующих препаратов центрального действия из различных терапевтических групп.

Для количественной оценки липофильности веществ используются коэффициенты распределения LogP и LogD. LogP характеризует липофильность нейтральных форм соединений. LogD учитывает распределение вещества в системе в зависимости от pH среды, поэтому важен для веществ, способных к существенной ионизации при физиологических значениях pH. Важное практическое значение имеет величина LogD при pH=7,4 (физиологическое значение pH среды крови человека), обозначаемая $logD_{7.4}$ [29]:

- $logD_{7.4}<1$: хорошая растворимость в воде, но низкая абсорбция и низкая пассивная диффузионная проницаемость ГЭБ.
- $1<logD_{7.4}<3$: идеальный диапазон. Эти соединения обычно обладают хорошей абсорбцией в кишечнике благодаря хорошему балансу растворимости и пассивной диффузионной проницаемости. Метаболизм минимизирован из-за более низкого связывания с метаболическими ферментами.
- $3<logD_{7.4}<5$: соединения в этом диапазоне имеют хорошую мембранную проницаемость, но более низкую биодоступность из-за низкой растворимости. Метаболизм увеличился вследствие увеличения связывания с метаболическими ферментами. Высоколипофильные соединения ($logD_{7.4}>3.5$), как правило, плохо растворимы в воде, что затрудняет абсорбцию в кишечнике; демонстрируют интенсивный метаболизм первого прохода, приводящий к быстрой биодеградации *in vivo* и снижающий биодоступность, особенно при пероральном введении; значительно связываются с белками или тканями плазмы; имеют повышенный потенциал ингибирования ферментов цитохрома P450 (особенно CYP3A4), увеличивая риск лекарственных взаимодействий; взаимодействуют с транспортерами, например P-гликопротеином, также увеличивая риск лекарственных взаимодействий; демонстрируют связывание со стеклом и пластиком, искажая результаты экспериментов *in vitro*.
- $logD_{7.4}>5$: соединения, как правило, имеют низкую абсорбцию и биодоступность из-за низкой растворимости. Метаболический клиренс высок из-за высокого сродства к метаболическим ферментам. Объем распределения (Vd) и период полувыведения ($t_{1/2}$) высоки, поскольку соединения накапливаются в тканях и медленно выводятся.

На рисунке 3 для иллюстрации приведены рассчитанные характерные зависимости LogD от pH среды представителей трех хемотипов анальгетиков.

ВОЗМОЖНОСТЬ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРЕПАРАТОВ НЕОТЛОЖНОЙ ТЕРАПИИ МНОГОЦЕЛЕВОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ИНТЕГРАЦИИ СИСТЕМНЫХ ПОДХОДОВ И АНАЛИЗА МАССИВОВ ДАННЫХ

В процессе систематизации и анализа больших объемов информации (Big Data) в области фармакологии происходит развитие подхода на основе учета большого числа взаимосвязанных биологических взаимодействий и физиологических процессов, вызываемых введением лекарственных средств, то есть на стыке подходов системной фармакологии [31] (рисунок 4) и полифармакологии [15, 32]. Основанные на механизмах взаимодействий фармакокинетические и фармакодинамические (PK/PD) модели и системные модели заболеваний (DS) входят в практику разработки лекарств [31]. Подходы на основе физиологически обоснованного фармакодинамического (PB-PD) моделирования связывают фармакокинетику с воздействием лекарств на процесс патологии и отражают процессы взаимосвязи между введением лекарственного средства и эффектом: распределение в области связывания, связывание с биомишенью и ее активация, а также трансдукция и гомеостатическая обратная связь (рисунок 4).

Применение принципов системной фармакологии для задач неотложной военно-полевой терапии обусловлено необходимостью купирования ряда одновременно и интенсивно действующих поражающих и опасных факторов с учетом полевых условий использования. При этом высока вероятность передозировки, поэтому терапевтический индекс (ТИ) должен быть высоким. Необходимо учитывать возможность массивной кровопотери и инфекционного заражения. Специфическим требованием является необходимость создания препаратов для экстремальных климатических условий. На примере анальгетиков видно, что используемые в настоящее время морфин и про-

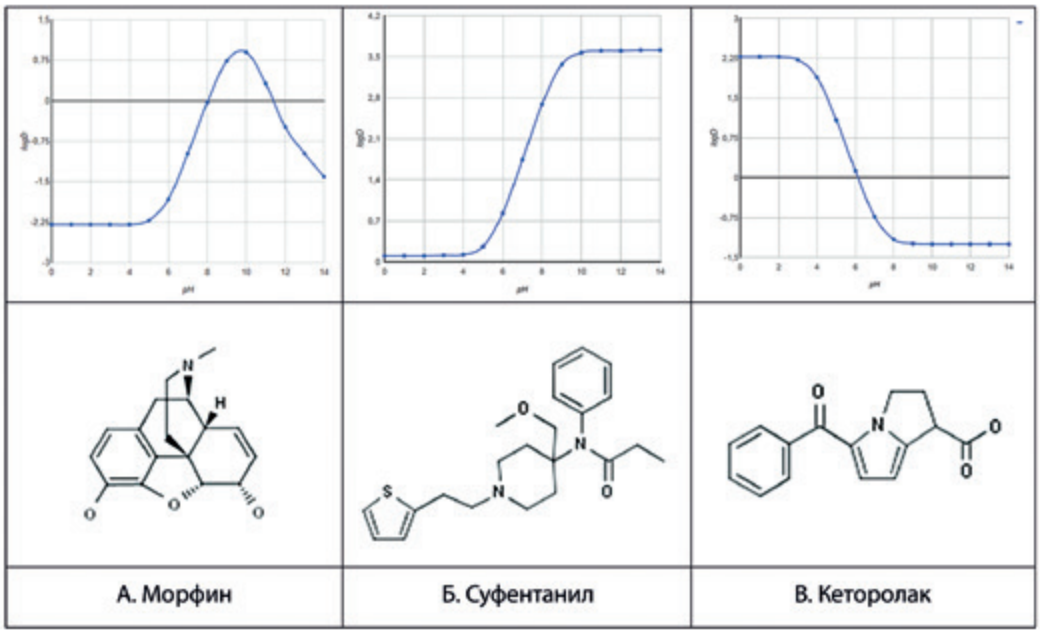


Рисунок 3. **Зависимость значений LogD (расчёт) анальгетиков морфина, суфентанила и кеторолака от pH среды [30]**

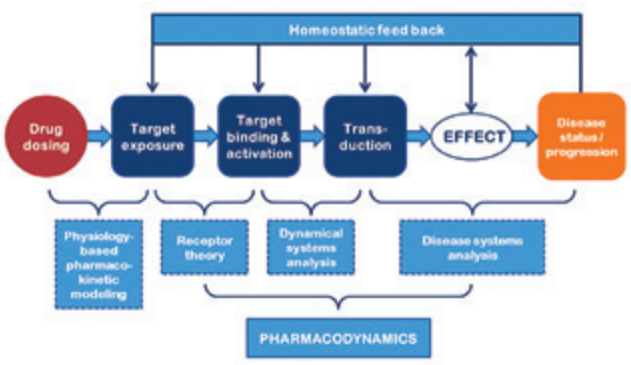


Рисунок 4. **Схематичное представление физиологически обоснованного фармакодинамического (PB-PD) моделирования [31]**

медол демонстрируют низкие значения ТИ. Морфин демонстрирует низкую скорость распределения из кровотока в целевые ткани ЦНС (таблица 1), имеет набор серьезных побочных эффектов. Наиболее быстродействующие инъекционные формы морфина не могут быть использованы при низких температурах.

Подходы Big Data при разработке фармпрепаратов находятся в стадии интеграции информации и создания систем анализа баз данных. В процессе разработки фармакологической концепции препаратов многоцелевого использования на основе быстро- и сильнодействующих и безопасных препаратов в составе миниатюрных медицинских изделий ФГУП «ГосЗМП» тестирует систему анализа и визуализации информации Drug Research Advisor [33] с использованием БД Integrity [34]. Сильнодействующие опиоидные анальгетики, как вещества, имеющие четкую зависимость «доза – эффект», представляются удобным типом фармакологически активных веществ (ФАВ), на основе которого целесообразно развивать научные и технологические подходы для создания новых фармпрепаратов центрального действия и проводить практическую отработку универсальных лекарственных форм. В результате может быть создана универсальная ЦНС-ориентированная фармацевтическая платформа для введения средств неотложной терапии. Фармацевтическая платформа в дальнейшем может быть использована для создания противорвотных препаратов, а также антидотов опиоидов и антидотов ТВ НПД, проявляющих как периферические, так и центральные эффекты.

Предлагаемый алгоритм (рисунок 1) создания универсальной фармацевтической платформы позволяет использовать универсальные методы исследований, оборудование и материалы, поэтому должен быть реализован в рамках специализированного центра исследований и разработок препаратов на основе сильнодействующих веществ.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРЕПАРАТЫ И СХЕМЫ НЕОТЛОЖНОЙ ПОЛЕВОЙ АНАЛЬГЕЗИИ

Исторически морфин производится для полевой анальгезии с 1827 г. В настоящее время в вооруженных силах некоторых стран НАТО используется штатный автоинъектор 10 мг / 0,7 мл внутримышечно. В США морфин может быть использован в сочетании с парацетамолом, НПВС и кетамином. Недавно в Англии введен в практику пероральный мукоадгезивный фентанил 400 мкг в качестве альтернативы морфину, который уже не удовлетворяет современным

требованиям к эффективности и безопасности [35]. Использование морфина связывают с проявлением побочных эффектов и увеличением смертности как в полевых условиях, так и в процессе транспортировки раненых вследствие угнетения дыхания и проявления седативных эффектов. Морфин увеличивает вероятность развития геморрагического шока. Также морфин подавляет иммунитет и снижает устойчивость к некоторым видам инфекций [36], что рассматривается как фактор развития раневых заражений. Он подавляет функциональную активность трех типов лейкоцитов: Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и естественных киллеров (NK) клеток [37], снижает эффективность как естественного, так и приобретенного иммунитета [38], препятствуя внутриклеточным путям, участвующим в иммунной регуляции, прямо или косвенно. Поэтому использование морфина нежелательно как для полевой анальгезии, так и для онкологических пациентов. Использование морфина для онкологии также нежелательно вследствие активации ангиогенеза опухоли и активации пролиферации опухолевых клеток [39, 40]. Данные недостатки морфина пытаются купировать переходом от исключительно опиоидной анальгезии к мультимодальной, что снижает риск развития респираторной депрессии, седации и развития раневых инфекций. Однако относительно невысокий уровень анальгетической активности морфина и относительно низкое быстродействие делает такие разработки малоперспективными для полевой анальгезии.

Развивается направление мощных местных анестетиков, например на основе природных токсинов [41], однако это не приведет к созданию реальных препаратов для полевой анальгезии в ближайшие 5–7 лет.

Согласно руководству по медицинскому обеспечению в боевых условиях Tactical Combat Casualty Care Guidelines 2014 (TCCC) манипуляции должны быть упрощены и унифицированы: слишком много вариантов и недостаточно четких указаний относительно того, какое лекарство следует использовать в конкретной ситуации [42, 43]. Отмечено, что кетамин в настоящее время иногда используется в качестве полевого анальгетика с хорошими результатами. В руководстве TCCC предлагается, чтобы обезболивание в процессе боевых действий достигалось с использованием одного или нескольких из трех возможных вариантов.

1. Для купирования боли от слабой до средней у пострадавших, которые еще могут активно функционировать, используются мелоксикам 15 мг/день и тайленол (парацетамол), таблетки 650 мг каждые 8 ч.
2. Для купирования боли от средней до сильной используется пероральный трансмукозный фентанила цитрат (OTFC), 800 мкг, для пострадавших, у которых нет риска развития геморрагического шока или угнетения дыхания. В качестве альтернативы OTFC возможно использование 5 мг морфина внутривенно. При использовании опиоидов необходимо наличие налоксона, который применяется в дозе 0,4 мг внутривенно или внутримышечно при развитии респираторной депрессии. При развитии угнетения дыхания важно использовать кислородную маску. При развитии тошноты и рвоты необходимо введение прометазина 25 мг каждые 6 ч внутривенно или внутримышечно. Прометазин может усиливать анальгетический и антимигренозный эффекты.
3. Для купирования от средней до сильной боли у пострадавших с риском развития геморрагического шока или угнетения дыхания используется кетамин 50 мг внутримышечно или интраназально, а также кетамин 20 мг при медленном введении внутривенно. Кетамин также можно использовать для увеличения обезболивающего эффекта у жертв, которым были введены опиоиды (морфин или фентанил), то есть возможно использование мультимодальной анальгезии «опиоид + кетамин». Использование кетамина позволяет снизить дозу опиоида [44], однако может приводить к нежелательным когнитивным, диссоциативным и галлюциногенным эффектам.

Таблица 1.

Свойства некоторых опиоидных и неопиоидных анальгетиков центрального действия, а также антидота налоксона, актуальных для неотложной полевой анальгезии

Анальгетик	Ki (эксп.), нМ* [55, 56]	MED	ТИ [57]	$t_{1/2}k_{e0}$ (эксп.), мин	logD$_{7.4}$ (расчет) [30]	logP (эксп.) [58, 59]	LD$_{50}$, мг/кг [59, 60]
Морфин	1,17	1	71	168	–0,8	0,89	156 мыши в/в
Гидроморфон	0,37	4	232	46	0,5	0,9	104 мыши в/в
Промедол	~150	0,5–1	~40	~10	1,2	~3	40 крысы п/к
Алфентанил	7,39	10–25	1080	1,4	2,15	2,16	47 крысы в/в
Фентанил	1,35	50–100	277	6,6	2,1	4,05	3,1 крысы в/в
Суфентанил	0,14	500–1000	26716	6,2	2,0	3,55	18,7 мыши в/в
Налоксон	1,52	–		6,5	1,0	2,09	107 крысы в/в
Кеторолак [61]	–	0,3		24	–0,7	2,1	189 крысы п/о
Кетамин [62] (S-кетамин)	–	0,3 (0,5)		~1	3,1	2,9	42,9 мыши в/в

Примечание: * Human MOR, замещение [3H]-DAMGO.

Приведенный пример использования подходов мультимодальной анальгезии в полевых условиях требует введения двух и более препаратов и наблюдения за пострадавшим, что сложно в данных условиях и требует подготовки. Таким образом, комбинирование традиционных препаратов анальгетиков требует квалификации, трудоемко и не ведет к существенному прогрессу военно-полевой анальгезии.

В качестве альтернативы морфину в РФ используются синтетические опиоиды – промедол (тримеперидин) (таблица 1), реже просидол, которые несколько уступают морфину по анальгетической активности [45], однако промедол немного превосходит морфин по быстродействию. На основе промедола также предпринимаются попытки создания схем мультимодальной анальгезии и КФС «опиоид + неопиоид» [46].

В качестве альтернативы опиоидам для купирования боли средней интенсивности широко используется уступающий морфину кеторолак [47, 48]. Данное ненаркотическое соединение обладает рядом преимуществ по сравнению со слабыми опиоидами, например меперидином [49], но обладает приемлемым для военно-полевой анальгезии эффектом и быстродействием только при внутривенном ведении. Кеторолак входит в состав индивидуальных медицинских комплектов гражданской защиты (КИМГЗ) [50], аптечек туриста и др.

РАЗВИТИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ПОЛЕВОЙ АНАЛЬГЕЗИИ

Подходы на основе мультимодальной терапии не решают проблему неотложной полевой анальгезии, поэтому разрабатывается ряд направлений, среди которых можно выделить как использование новых субстанций (веществ, синергических КФС или конъюгатов), так и использование новых лекарственных форм. Учитывается опыт разработки наиболее близких аналогов – средств купирования прорывной боли, например у онкологических пациентов, препаратов для купирования постоперационной, контролируемой пациентом боли, а также опыт использования мощных ветеринарных анальгетиков и анестетиков. Иллюстративно процесс можно представить как замену инъекционного морфина (или его аналогов) на более быстродействующие и более мощные опиоиды в более удобных и универсальных лекформах, а также разработку более безопасных мультитаргетных препаратов на основе опиоидов. Для использования в условиях холодного климата актуальна замена инъекционных форм (замерзающие водные растворы, требующие стерильности) на быстродействующие неинъекционные формы, в том числе трансмукозные – буккальные, сублингвальные и назальные неводные. Атравматичные для пациентов трансмукозные формы минимизируют различия между средствами полевой анальгезии и препаратами для купирования прорывной и постоперационной боли у пациентов. Данные лекформы на основе опиоидов непригодны для немедицинского использования с целью получения сильного наркотического эффекта, поскольку их внутривенное введение невозможно из-за наличия неотделяемых полимерных компонентов матрицы, введение которых в кровоток приведет к серьезным побочным эффектам, то есть реализован принцип защиты от немедицинского использования, рекомендованный FDA [51]. Можно выделить следующие тенденции:

- использование сильнодействующих опиоидов с морфиновым эквивалентом дозы (MED) более 10 и с высокой скоростью распределения вещества из кровотока в ЦНС, характеризуемой значением времени полупериода распределения анальгетика плазма/ткани ЦНС $t_{1/2}k_{e0}$ [28] менее 10 мин;
- использование синергических комбинаций фиксированного состава или конъюгатов «опиоид + неопиоид», желательно с эффектом потенцирования [17, 52];
- разработка улучшенных транспортных форм для сильнодействующих субстанций;
- работы по введению в практику сильных ненаркотических анальгетиков, например природных токсинов – блокаторов ионных каналов нейронов [41], в качестве основного действующего соединения.

В настоящее время альтернативы опиоидам как универсальному средству фармакотерапии сильной травматической боли в полевых условиях практически нет. Для разработки новых препаратов для неотложной анальгезии используются представители хемотипа фентанилов, в основном фентанил. Фентанил и более гидрофобный представитель класса морфинов бупренорфин (LogP=4.98) [53] также часто используются в пролонгированных формах, включая трансдермальные [54].

При разработке новых неинъекционных быстродействующих лекформ наиболее часто используются мощные и быстродействующие фентанил и суфентанил, значения их полупериода распределения $t_{1/2}k_{e0}$ близки к оптимальному для распределения лекарства из кровотока через ГЭБ в ткани ЦНС (таблица 1). Гидрофобность данных веществ при физиологических pH находится в области, оптимальной для пассивной трансмукозной диффузии. Величины MED фентанила и суфентанила отличаются примерно на порядок (таблица 1). Уступающий им по эффективности обезболивания алфентанил демонстрирует анальгетический потенциал 10–25 MED, ниже которого использование анальгетиков в быстродействующих неинъекционных формах, вероятно, нецелесообразно. В высокотехнологичных зарубежных разработках существенное внимание уделяется суфентанилу, как наиболее мощному

и безопасному из числа быстродействующих анальгетиков. В таблице 1 представлены усредненные данные по морфиновому эквиваленту дозы (MED), терапевтическому индексу (TI), полупериоду установления равновесия плазма/ЦНС ($t_{1/2}k_{e0}$), коэффициенту распределения (LogP) и острой токсичности (LD_{50}) опиоидов и неопиоидов, актуальных для полевой анальгезии.

Из данных таблицы 1 видно, что морфин сильно уступает фентанилам и гидроморфону по интенсивности обезболивания. При этом аффинность морфина к mu-опиатному рецептору (MOR), характеризуемая величиной Ki, практически идентична аффинности значительно более сильного анальгетика фентанила. Всем остальным анальгетикам из таблицы 1 морфин уступает по скорости распределения из кровотока в ткани ЦНС, которая характеризуется экспериментальной величиной – полупериодом установления равновесных концентраций $t_{1/2}k_{e0}$. Это демонстрирует один из ключевых недостатков морфина и его аналогов – низкую способностью преодолевать ГЭБ [63]. Основной активный метаболит морфина – морфин-6-О-глюкуронид (M6G, эквипотенциален морфину), еще медленнее проникает в целевые ткани ЦНС – $t_{1/2}k_{e0}$=384 [64]. На рисунке 5А схематично показано существенное (почти на порядок) различие в концентрациях морфина [65, 66] и его активного метаболита M6G в плазме и целевых тканях мозга при внутривенном введении морфина.

Соотношение равновесного содержания вещества в плазме и целевой ткани ЦНС количественно характеризуется и является одним из ключевых аспектов оценки эффективности лекарства [24]. Сравнение картин распределения морфина и суфентанила (рисунок 5) иллюстрирует, что перспективные вещества центрального действия должны быть отобраны (при прочих близких условиях) на основании соотношения концентраций равновесного распределения *in vivo* в ткани ЦНС/плазме. Для предварительной оценки распределения используется определяемый в тесте *in vitro* коэффициент распределения $LogD_{BPL}$ [67].

Морфин используется для неотложной анальгезии только в форме инъекции. Попытки создания пролекарств с улучшенными PK-свойствами на основе морфина, например исследование несколько более мощных *in vivo* дипропаноилморфина, диаморфина (героина), никоморфина и других, не привели к существенным практическим результатам. Липофильные пролекарства морфина получены на основе производных бензиловой кислоты [68]. Улучшение проникновения данных эфиров через барьеры не компенсирует высокую терапевтическую дозу и низкое быстродействие морфина, выделяющегося при их метаболизме. Анализ имеющейся информации показывает, что использование морфина является весьма проблемным направлением в попытках создания препаратов неотложной терапии. Ситуацию, вероятно, сможет изменить получение эффективного солекарства на его основе. Несколько интереснее ситуация с пролекарствами гидроморфона (более афинного агониста MOR, чем фентанил): 3-аспирин-гидроморфон и 3,6-диаспирин-гидроморфон (asalhydromorphone) демонстрируют улучшенные PK-свойства [69].

Мощные агонисты опиатных рецепторов фентанилы демонстрируют оптимальную липофильность ($logD_{7.4}$~2), эффективно проникают в кровоток через слизистые оболочки и кожные покровы и быстро перераспределяются из кровотока в ткани ЦНС ($t_{1/2}k_{e0}$ от 1 до 7, таблица 1), поэтому могут быть использованы для создания разнообразных лекарственных форм. Для быстрой анальгезии разрабатываются трансмукозные формы (сублингвальные, буккальные, назальные) быстрого высвобождения, например Transmucosal Immediate-Release Fentanyl (TIRF) Medicines [70], для пролонгированного введения используются трансдермальные формы фентанила [71]. Разработка мультитаргетных трансмукозных препаратов на основе фентанилов является следующим этапом, направленным на создание быстродействующих и более безопасных (по сравнению со всеми имеющимися в настоящее время) анальгетиков на основе опиоидов.

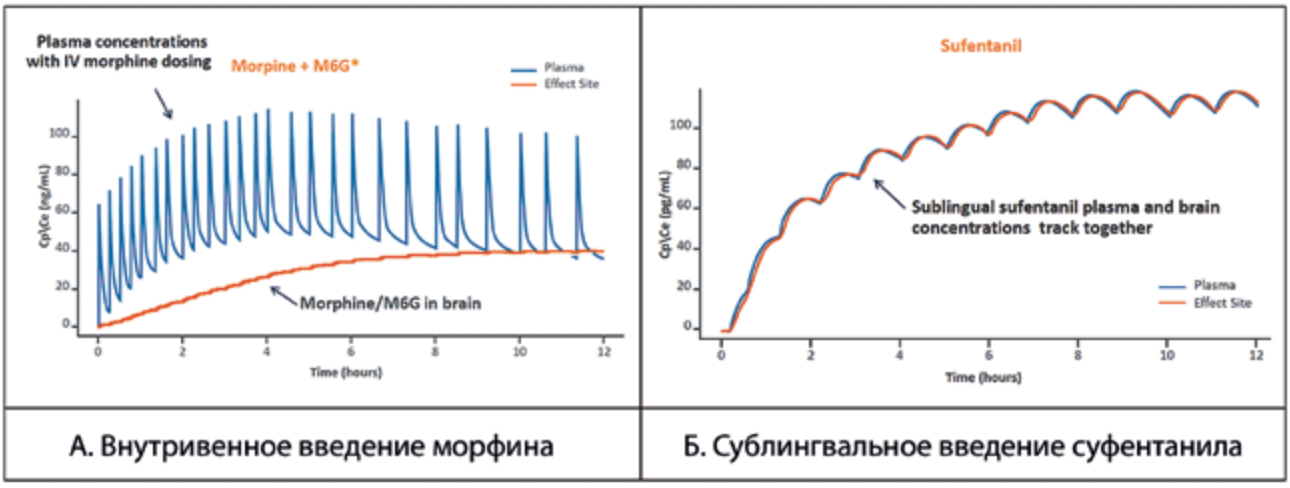


Рисунок 5. Соотношение концентраций в плазме (синий) и целевых тканях ЦНС (коричневый) при введении морфина (включая его активный метаболит M6G) и суфентанила [66]

Суфентанил является одним из наиболее сильнодействующих и наиболее безопасных анальгетиков, одобренных для клинического использования. Сравнение его параметров с параметрами традиционных для неотложной анальгезии морфина и используемого в РФ промедола (таблица 1) демонстрирует уникальные свойства суфентанила в качестве быстродействующего и безопасного опиоидного анальгетика или основного компонента мультитаргетной комбинации с улучшенными свойствами. При практически равных значениях $t_{1/2}k_{e0}$ (~6 мин) суфентанил в 5–12 раз сильнее фентанила, его терапевтический индекс (ТИ) примерно на два порядка выше ТИ фентанила и составляет более 26 тысяч [27, 72], что уникально для мощных анальгетиков-опиоидов. Близкие к оптимальным PK/PD-свойства суфентанила [73–78] обеспечивают высокую биодоступность, эффективное преодоление ГЭБ (рисунок 5Б), высокое быстродействие. Уникально высокий терапевтический индекс резко снижает риск передозировки в полевых условиях. Ключевые фармакокинетические параметры различных лекарственных форм суфентанила приведены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 следует, что буккальная форма суфентанила обладает максимально возможной биодоступностью для неинъекционной формы (F=82,5% от биодоступности при в/в введении). Внутривенное введение суфентанила приводит к резкому скачку концентрации примерно на порядок выше терапевтически необходимого уровня (рисунок 6). Биодоступность суфентанила при пероральном введении низкая (F=7,4%).

Сочетание уникально низкой терапевтической дозы, высокого быстродействия, высокого терапевтического индекса, стабильности и хорошей биодоступности при разных путях введения [65, 66, 73–78] делает суфентанил одним из лучших действующих компонентов для разработки широкого спектра лекформ, включая атравматичные трансмукозные для неотложной анальгезии. Молекула суфентанила (рисунок 3Б) не содержит групп, позволяющих синтезировать пролекарства на его основе. Его включение в состав препаратов возможно либо в форме свободного основания, либо в форме соли или нековалентного конъюгата.

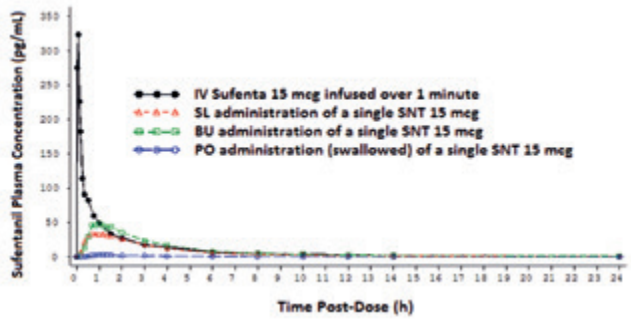


Рисунок 6. Изменение концентрации суфентанила в плазме крови человека после однократного использования различных лекарственных форм, содержащих 15 мкг вещества [73]

КРИТЕРИИ ВЫБОРА ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ АНАЛЬГЕТИКОВ, В ТОМ ЧИСЛЕ И С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФАРМАКОЭКОНОМИКИ

Выше показаны элементы алгоритма отбора наиболее эффективных анальгетиков для создания широкого спектра сильно- и быстродействующих лекформ, включая трансмукозные препараты, пригодные для полевой анальгезии. При внутривенном введении эквианальгетических доз алфентанил действует быстрее благодаря более быстрому установлению равновес-

Таблица 2.

Фармакокинетические свойства суфентанила при внутривенном (IV), сублингвальном (SL), трансбуккальном (BU) и пероральном (PO) введении [73]

PK Parameter		IV	SL	BU	PO
AUC_{0-t} ч · пг/мл	Mean (SD) GeoMean (CV)	250,42 (59,95) 242,3 (23,94)	145,63 (45,42) 138,4 (31,18)	191,92 (55,17) 183,1 (28,75)	12,90 (11,04) 8,1 (85,58)
$AUC_{0-\infty}$ ч · пг/мл	Mean (SD) GeoMean (CV)	273,84 (61,09) 267,7 (22,31)	163,39 (52,54) 154,5 (32,16)	212,47 (56,97) 204,4 (26,81)	24,87 (14,08) 21,3 (56,62)
F, %	Mean (SD) Median	100,0 (0,0) 100,0	59,2 (12,9) 60,9	78,1 (16,1) 82,5	8,9 (4,7) 7,4
C_{max}, пг/мл	Mean (SD) GeoMean (CV)	445,05 (312,02) 361,4 (70,11)	40,59 (14,81) 37,7 (36,48)	58,87 (25,68) 53,0 (43,63)	4,33 (3,78) 3,3 (87,43)
T_{max}, ч	Mean (SD) Median	0,05 (0,03) 0,07	0,.89 (0,34) 0,83	1,05 (0,45) 0,85	1,22 (0,47) 1,11
$CST_{1/2}$, ч	Mean (SD) Median	0,18 (0,14) 0,14	2,61 (0,86) 2,50	2,08 (1,07) 2,28	2,15 (1,04) 2,00
$t_{1/2}$, ч	Mean (SD) Median	11,34 (7,62) 10,54	9,65 (7,25) 7,21	9,40 (7,70) 5,28	6,18 (6,60) 4,43
CL, мл/ч	Mean (SD) Median	57619 (14047) 52883	NA	NA	NA

ной концентрации в ткани мозга/кровь ($t_{1/2}k_{e0}$=1,4 мин), далее следует значительно более мощный суфентанил ($t_{1/2}k_{e0}$=6,2 мин), затем фентанил ($t_{1/2}k_{e0}$=6,6 мин) [72, 74]. Данные фентанилы являются основными опиоидами выбора при разработке мощных препаратов-анальгетиков с заданными свойствами. Наиболее быстродействующий анальгетик и анестетик из хемотипа фентанилов – ремифентанил ($t_{1/2}k_{e0}$=1,1 мин, MED=100–200) используется только для инфузионного введения вследствие быстрого метаболизма.

Изучение распределения опиоидов в ткани мозга из кровотока в адекватной для данных веществ модели мышей [65] показывает, что при использовании эквианальгетических доз суфентанил вызывает анальгезию при наименьшей концентрации в ткани ЦНС. Эффективные анальгетические концентрации опиоидов в ткани мозга мышей увеличиваются в ряду суфентанил ≤ фентанил < алфентанил ≤ морфин < лоперамид ≤ метадон ≤ меперидин в диапазоне от ~0,3 нг/г до более 1 мкг/г. Соотношение концентраций опиоида в ткани ЦНС/сыворотке в данной модели для 7 веществ снижается в следующей последовательности меперидин > фентанил > метадон > суфентанил > 1 > алфентанил > морфин > лоперамид в диапазоне примерно от 8 до 0,05. Значение данного параметра более 1 означает, что концентрация опиоида в тканях ЦНС выше, чем в сыворотке. Опиоиды с соотношением более 1 демонстрируют отличную способность преодолевать ГЭБ и высокое сродство к тканям ЦНС. При прогнозировании проницаемости ГЭБ используется расчетный параметр распределения LogBB, определяемый соотношением концентрации лекарства в ткани мозга к концентрации лекарства в крови, то есть LogBB = [drug]brain/[drug]blood [109]. В реальном эксперименте *in vivo* соотношение концентраций вещества в мозге и плазме не для каждого вещества остается относительно постоянным даже при установлении формального равновесия [65].

Таким образом, комбинация ключевых параметров: терапевтически эффективной дозы ED_{50} при разных путях введения, ТИ, быстродействия, коррелируемого (обратно пропорционального) с величиной параметров T_{max} и $t_{1/2}k_{e0}$, EC_{50} в крови и ЦНС, соотношения концентрации опиоида в ткани ЦНС/сыворотке, скорости метаболизма, активности метаболитов и других фармакокинетических характеристик активного вещества (таблица 2) – определяют первичный выбор лекарства как для разработки конкретной лекформы с требуемыми терапевтическими свойствами, так и для прогноза возможности его использования в составе разнообразных лекарственных форм. Время T_{max} определяется как веществом, так и видом используемой для его введения лекарственной формы (таблица 2). Весьма полезным параметром было бы время образования максимальной концентрации в целевых тканях ЦНС в адекватной модели *in vivo*, что является характеристикой ЦНС-ориентированного препарата, определяемой сочетанием вещества и лекарственной формы. Однако данный параметр практически не используется ввиду сложности моделирования и трудоемкости экспериментального определения.

Анализ соотношения данных параметров позволяет объяснить, почему весьма слабые агонисты опиатных рецепторов – промедол и просидол (аналоги меперидина) – на практике показывают неплохие результаты анальгезии, сравнимые с действием морфина, значительно более мощного ($Ki/Ki_{морфина}$ > 150) агониста опиатных рецепторов человека. Тогда как эффективные анальгетические дозы фентанилов и их величина MED хорошо коррелируют с экспериментальными значениями афинности (Ki_{MOR}) в отношении мю-опиатного рецептора (таблица 1). В случае неоптимального значения PK-параметров рассматривается возможность разработки коньюгатов, про- и солекарств с заданными свойствами (рисунок 1, красным).

Таким образом, с точки зрения разнообразия лекарственных форм разработку новых препаратов сильнодействующих анальгетиков целесообразно проводить на основе веществ с высокими значениями MED и ТИ, а разработку быстродействующих препаратов – с наиболее низкими значениями T_{max} и $t_{1/2}k_{e0}$. При использовании опиоидов с MED≥100 содержание действующего вещества в препарате должно быть менее 0,1%, что не ограничивает использование разнообразных вспомогательных веществ и технологических решений, позволяющих создавать миниатюрные препараты с заданными свойствами.

Сравнение PK/PD-параметров, определяющих выбор анальгетика для разработки эффективных форм – фентанилов и традиционных наркотических анальгетиков природного происхождения, в том числе морфина, объясняет выраженную в экономически развитых странах тенденцию замены природных соединений на более эффективные и безопасные синтетические опиоиды. Это может быть наглядно продемонстрировано (рисунок 7) на примере опережающей динамики производства и потребления суточных доз препаратов синтетических опиоидов в общем объеме их мирового потребления [79, 80].

Расчет потребности РФ в сильных анальгетиках дает величину 5–6 тонн/год в морфиновом эквиваленте [80]. В последние годы объем производства отечественных препаратов в морфиновом эквиваленте находится на уровне немного более 300 кг/год. Поэтому фактически необходимо заново организовать в России производство сильнодействующих субстанций и препаратов сильных анальгетиков. При этом выбор действующих веществ должен обеспечить как необходимое терапевтическое разнообразие, то есть купирование различных видов боли, так и разнообразие лекарственных форм в соответствии с различными задачами анальгезии (включая военно-полевую), фармакоэкономики с учетом склонности пациентов к использованию атравматичных лекформ.

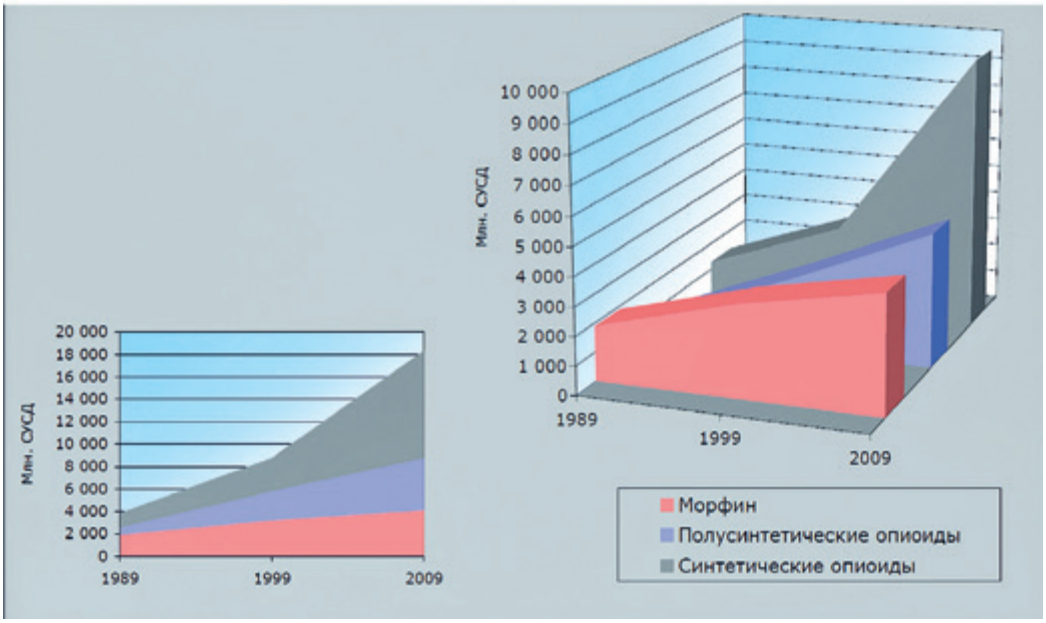


Рисунок 7. Динамика мирового производства препаратов опиоидов для медицинского использования в миллионах статистических условных (поддерживающих) суточных доз (СУСД/S-DDD) за 20 лет [80]

Использование веществ с высокими значениями MED (при прочих близких условиях) является лучшим выбором как с точки зрения организации производства субстанций, так и разнообразия готовых форм. Для сравнения: необходимый для РФ годовой объем производства 5–6 тонн в морфиновом эквиваленте равен получению до 10 кг/год субстанции суфентанила. Такое количество субстанции может быть наработано на лабораторной или полупромышленной установке небольшого размера.

Разнообразие препаратов определяется выбором всех активных компонентов. В статье [17] описаны преимущества мультитаргетных анальгетиков и примеры комбинаций «опиоид + неопиоид», критерии анальгетической активности, PK-PD-совместимость с опиоидами в составе одного препарата, обеспечивающая синергизм в сравнимых действующих дозах. Необходимым критериям соответствуют некоторые анальгетики, а также усиливающие эффекты опиоидов анестетики, анксиолитики и седативные вещества центрального действия в основном из следующих классов:

- агонисты альфа-2-андренорецепторов ЦНС [46, 52, 81, 82];
- антагонисты рецепторов возбуждающих аминокислот, главным образом антагонисты NMDA-рецепторов [83–85], а также антагонисты AMPA- и каинатных рецепторов (AMPA/KA-GluR-антагонисты) [86, 87];
- ГАМК-лиганды, ГАМК-производные и аналоги, действующие на различные биомишени [88–93];
- каннабиоиды (агонисты каннабиноидных рецепторов CB_2 и CB_1) [94–98];
- ингибиторы обратного нейронального захвата моноаминов (норадреналина, серотонина, дофамина) [98–101].

Данные типы соединений активно исследуются в моделях комплексной анальгезии совместно с опиоидами для создания более эффективных и безопасных мультитаргетных препаратов. Однако использование синергических комбинаций именно для полевых анальгетиков накладывает дополнительные ограничения, связанные с характером поражений и условиями использования [46, 52].

С точки зрения фармакоэкономики анальгезия с использованием простых инъекционных форм морфина в условиях клиники является крайне невыгодной, поскольку стоимость ампулы инъекционного морфина (0,8–1,2 евро) составляет примерно 1% от совокупной стоимости всего процесса инфузионной анальгезии (122–132 евро), включая стоимость введения (20–26 евро) и стоимость купирования побочных эффектов (102–104 евро) его инъекционного использования [102, 103]. Структура совокупной стоимости внутривенной инфузионной анальгезии морфином в 5 странах ЕС и в среднем по ЕС представлена на рисунке 8.

По результатам фармакоэкономической оценки [102] использования внутривенного морфина в 5 странах Европейского сосюза (ЕС) сделаны следующие заключения.

1. Хотя внутривенный морфин обеспечивает быстрое и эффективное снижение боли при неотложной терапии, совокупная стоимость его использования, включая затраты на его использование,

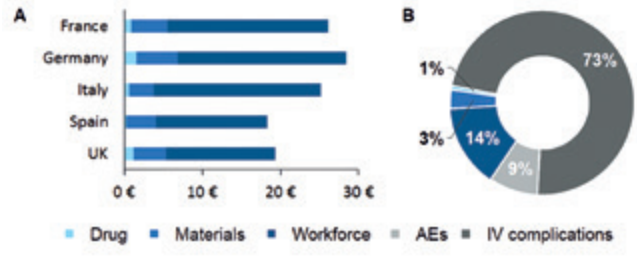


Рисунок 8. Распределение стоимости по странам. (А) – стоимость внутривенного инфузионного введения морфина по каждой из 5 стран ЕС. (В) – структура совокупной стоимости анальгезии с использованием морфина в ЕС, включая стоимость самого фармпрепарата (1%), материалов и трудозатрат медперсонала, стоимость купирования побочных эффектов введения (AEs), а также терапию осложнений (IV complications)

купирование побочных эффектов и осложнений, является существенным экономическим бременем для системы здравоохранения стран ЕС.

2. Подобный морфину, быстрый и эффективный, анальгетик, который, однако, не требует внутривенного введения, должен привести к существенному снижению экономических затрат, поскольку более высокая стоимость новых быстродействующих препаратов сильных анальгетиков (в идеале атравматичных неинъекционных) будет компенсирована снижением стоимости анальгезии пациента в целом.

Поскольку производство опиоидных анальгетиков в РФ является прерогативой государственных организаций, то можно перефразировать: «государство не настолько богато, чтобы производить дешевые фармпрепараты на основе опиоидов». Предполагается, что по мере продвижения сверху вниз по схеме выбора (разработки) соединений и лекарственных форм для задач неотложной терапии (рисунок 1) вклад стоимости самих препаратов в структуру совокупной стоимости терапии будет возрастать, трудоемкость и расходы на введение препаратов, общая стоимость фармакотерапии – снижаться. Создание быстродействующих неинъекционных форм для купирования сильной травматической боли в полевых условиях является задачей на грани возможностей современных фармтехнологий, поэтому ее решение даст импульс развитию передовых технологий в различных сегментах фарминдустрии РФ и приведет к снижению стоимости купирования сильной и средней боли в целом.

ДРУГИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ НЕОТЛОЖНОЙ ВОЕННО-ПОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Научные принципы и технологические решения, отработанные при создании неинъекционных препаратов мощных анальгетиков центрального действия [104, 105], как веществ, демонстрирующих четкую зависимость «доза – эффект», могут быть использованы для создания лекарственных форм других лекарств, в первую очередь противорвотных препаратов и двух типов антидотов – антидотов опиоидов и антидотов ТВ НПД, проявляющих не только периферические, но и центральные токсические эффекты. Общее фармацевтическое решение может быть выполнено на основе единой технологической платформы для введения неинъекционных препаратов сильно- и быстродействующих лекарств центрального действия.

Противорвотные средства являются традиционным компонентом индивидуальных аптечек военнослужащих различных армий для купирования первичной реакции на радиоактивное облучение или перегрузки – тошноты и/или рвоты, а также при возникновении тошноты и рвоты в результате контузии и/или ранения. В составе комплектов неотложной полевой терапии используются пероральные противорвотные лекарства, например прометазин и перфеназин, которые могут быть заменены на более эффективные, в том числе полифармакофорные, соединения, обладающие также анальгетической активностью или антидотной активностью в отношении опиоидов или веществ, действующих на системы проведения нервных импульсов в ЦНС. К лекарственным соединениям, сочетающим противорвотную и анальгетическую активность, относятся набитан, метоклопрамид, дронабиол и его пролекарство гемисукцинат, дексмедетомидин, тегопразин, а также соединения – кандидаты в лекарства: AA-10021, GR-82334, L-701324, CP-99994, GR-203040, ARN-272, CAM-2058 [34]. В качестве противорвотной комбинации фиксированного состава со свойствами анальгетика и антимигренозного средства можно привести препараты ALLOD-2 [106] и CL-108 (КФС прометазин/гидрокодон/ацетаминофен). К лекарственным соединениям, сочетающим противорвотную активность и антагонизм к опиатным рецепторам, относятся метилналтрексон и налмедин [34].

Антидот опиоидов налоксон (таблица 1), обладающий высоким быстродействием (T_{max}=4 мин при в/в введении, $t_{1/2}k_{e0}$=6,5 мин), наиболее часто используется для купирования побочных эффектов. Терапевтический интервал купирования респираторной депрессии у человека при внутривенном введении находится в интервале от 0,4 до 3 мг для человека массой 70 кг. Используются препараты для внутривенных и внутримышечных инъекций и трансмукозный назальный спрей. Целесообразна разработка буккальных и сублингвальных форм для трансмукозного введения, как наиболее компактных, недорогих и пригодных для низких температур.

Разработка антидота от известных и возможных нервно-паралитических агентов (сочетающих периферическое и центральное действие) на основе расширения спектра использования известных средств терапии нейродегенеративных заболеваний технически возможна [107] и обусловлена текущей ситуацией. С одной стороны, в настоящее время токсичные фосфорорганических инсектициды не являются основными

средствами борьбы с насекомыми (как 30–40 лет назад), производятся и используются в основном в экономически отсталых странах, а основные заявленные мировые запасы нервно-паралитических ОВ близки к полному уничтожению. Это, впрочем, не исключает наличие запасов ОВ у стран, не подписавших конвенцию [7]. С другой стороны, объем производства пестицидов постоянно увеличивается [8–10]. Имеется опасность диверсионного и террористического использования наиболее эффективных нервно-паралитических токсикантов и их модифицированных форм, сочетающих периферические и центральные токсические эффекты. При этом возможно развитие не только острых токсических эффектов, но и отставленных патологий, например отставленной нейротоксичности (OPIDN). Усиление центральных эффектов у веществ нервно-паралитического действия приведет не только к увеличению острой токсичности, но и к проявлению выраженного несмертельного токсического, трудно поддающегося купированию (калечащего) действия различной природы, а также резко усложняет процесс лечения пораженных [19–23]. При этом крайне сложно прогнозировать как тип возможного агента, так и формы его применения [108]. Поэтому целесообразно наличие запаса универсального антидота, сочетающего возможность купирования как периферических, так и центральных эффектов ТВ НПД.

В условиях неопределенности актуальна разработка средств профилактики, купирования и лечения нейродегенеративных заболеваний ЦНС холинэргиченской природы с возможностью использования их в качестве антидота от ТВ НПД как пестицидов, так и ОВ. Предполагается, что данные средства будут массово производится для терапии нейродегенеративных заболеваний, весьма характерных для пациентов старшего возраста, например болезни Альцгеймера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ тенденций развития препаратов для неотложной (включая военно-полевую) анальгезии в экономически развитых странах показывает:

1) морфин (или его аналоги) заменяется на более быстро- и сильнодействующие и более безопасные анальгетики, обеспечивающие обезболивание как при внутримышечном, так при трансмукозном введении;

2) быстродействие и биодоступность некоторых анальгетиков при использовании в составе трансмукозных форм близки к значениям при внутримышечном введении;

3) актуально различное использование лекарственных форм, например инъекционная форма также должна быть эффективна и при назальном введении;

4) традиционные природные и полусинтетические анальгетики заменяются превосходящими их по основным параметрам синтетическими анальгетиками. Используемые в РФ синтетические промедол и просидол имеют низкий потенциал для разработки улучшенных лекформ, поскольку могут использоваться в полевых условиях только в виде инъекций;

5) мультимодальная анальгезия в полевых условиях способна улучшить выживаемость по сравнению с инъекционным морфином, но требует квалифицированной неотложной помощи пострадавшему;

6) буккальные и сублингвальные мукоадгезивные формы некоторых фентанилов рассматриваются как наиболее перспективные монопрепараты;

7) перспективным высокотехнологичным направлением является разработка мультитаргетных быстродействующих препаратов анальгетиков и других средств неотложной полевой терапии;

8) мультитаргетные анальгетики состава «опиоид + неопиоид» находятся в стадии разработки в форме инъекционных препаратов;

9) на основе нескольких мощных анальгетиков делаются попытки создания линейки готовых форм с широким спектром заданных свойств, включая инъекционные и неинъекционные формы, быстродействующие и пролонгированные формы: инъекционные и назальные растворы, тонкие пленки (вайферы), мукоадгезивные рассасываемые таблетки, пластыри и др. С точки зрения медицины это позволяет расширить разнообразие препаратов и унифицировать использование наиболее подходящих для полевой анальгезии лекформ. С точки зрения производства это позволяет унифицировать и удешевить фармтехнологии, унифицировать производство субстанций;

10) разработка сложных анальгетиков с заданными параметрами приводит к развитию и усложнению методов тестирования веществ и препаратов, способствует разработке более чувствительных инструментальных методов количественного химического анализа (КХА), внедряются новые, более детализированные модели *in vivo* и *in vitro*;

11) в соответствии с логикой многоцелевого использования происходит научно и технологически взаимодополняющая разработка как препаратов для полевой анальгезии, так и препаратов для купирования острой (прорывной) боли различного происхождения;

12) имеется тенденция перехода от инъекционных на атравматичные неинъекционные формы, что позволяет резко снизить затраты на введение препаратов, включая трудозатраты медпресонала;

13) развитие концепции контролируемой пациентом анальгезии способствует приближению совокупной стоимости анальгезии к стоимости препарата. Тогда как совокупная стоимость инфузионной

анальгезии морфином более чем в 100 раз выше стоимости самого препарата;

14) доля производства и потребления препаратов синтетических опиоидов (в СУСД/S-DDD) в общем объеме опиоидных анальгетиков для гражданских задач существенно увеличивается, а природных снижается. Аналогично увеличивается значимость синтетических анальгетиков для задач военно-полевой медицины;

15) проводятся клинические исследования быстродействующих препаратов для купирования сильной боли на основе неопиоидных анальгетиков. Однако данным требованиям отвечает крайне ограниченное число веществ, в основном блокаторы ионных каналов ПНС. Практические результаты ограниченны, поэтому реальной альтернативы опиоидам как основе средств неотложной полевой анальгезии в настоящее время нет;

16) разработка новых лекарственных форм для полевого использования должна соответствовать требованиям к температурному режиму применения и хранения препаратов, что делает крайне нежелательным использование растворов на водной основе и существенно ограничивает рассмотрение инъекционных форм в качестве перспективных. Специфические требования усложняют задачу военно-полевой анальгезии и сужают разнообразие выбора по сравнению с разработкой препаратов для купирования, например, прорывной онкологической или постоперационной боли. Проведение специфических исследований удорожает разработку;

17) увеличивается разнообразие средств купирования побочных эффектов опиоидной анальгезии;

18) препараты на основе опиоидов с защитой от немедицинского использования становятся стандартом фарминдустрии.

Анализ ситуации в России в области модернизации как препаратов для неотложной полевой анальгезии, так и препаратов сильно- и быстродействующих анальгетиков в целом демонстрирует некоторый прогресс только в отдельных сегментах. Необходимо создавать производство эффективных и безопасных сильнодействующих анальгетиков фактически заново как по объему и номенклатуре субстанций, так и по видам готовых форм. Со своей стороны, ФГУП «ГосЗМП» в настоящее время [17, 41, 80, 110–114] развивает:

- направление получения и использования субстанций синтетических и полусинтетических анальгетиков, анксиолитиков и других сильнодействующих веществ центрального действия;
- направление синтетических и природных ненаркотических анальгетиков (включая тетродотоксин, не уступающий наиболее сильным опиоидам) и местных анастетиков периферического действия;
- научные и технологические основы создания мультитаргетных препаратов центрального и периферического действия;
- направление готовых форм – игольных и безыгольных инъекционных форм, трансмукозных быстродействующих форм, пролонгированных трансдермальных и пероральных форм;
- концепцию неинъекционных атравмвтичных лекарственных форм с заданными фармацевтическими свойствами, включая практическую разработку: (1) универсальной гидрофильной матрицы для пролонгированного трансдермального введения анальгетиков, анксиолитиков и других психоактивных лекарств, (2) универсальной трансмукозной фармацевтической платформы для быстрого неинъекционного введения сильнодействующих лекарств.

Ситуация осложняется фактическим отсутствием в РФ специализированных центров исследований и разработок контролируемых фармацевтических препаратов и изделий, отсутствием кооперации между государственными организациями, разрабатывающими и/или производящими отдельные препараты на основе контролируемых веществ, отсутствием заинтересованности научных организаций РФ в деятельности, требующей лицензирования работ с наркотиками, отсутствием государственной программы и концепции разработки, производства и использования сильнодействующих контролируемых препаратов.

Согласно законодательству РФ, в области веществ и препаратов контролируемого использования (включая наркотические и психотропные) могут работать только государственные лицензированные организации, *любая деятельность в этой области может быть инициирована только органами исполнительной власти* [115]. Согласно ФЗ «Об обеспечении единства измерений» [116] в области контролируемых фармперпаратов должна функционировать система метрологического обеспечения, включая использование государственных стандартных образцов (ГСО). Однако в РФ практически отсутствует декларируемая законодательством метрология как в области хозяйственно значимых сильнодействующих контролируемых веществ и препаратов, так и в области соединений, запрещенных к обороту [80, 113, 114, 117].

Таким образом, исполнительной властью РФ должна быть инициирована программа разработки и внедрения новых сильнодействующих фармпрепаратов для неотложной терапии. В результате должна быть определена номенклатура субстанций и предпочтительные типы фармпрепаратов, а также объем их производства, разработана программа метрологического сопровождения контролируемых веществ и изделий. Необходимо создать как минимум один специализированный химико-фармацевтический и аналитический центр исследований и разработок силь-

нодействующих контролируемых субстанций и фармпрепаратов на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Modjarrad, V.S. Moorthy, P. Millett, P.S. Gsell, C. Roth, M.P. Kieny. Developing Global Norms for Sharing Data and Results during Public Health Emergencies // PLoS Med. 2016. V. 13(1). P. 1–5.
2. P. Vallance, A. Freeman, M. Stewart. Data Sharing as Part of the Normal Scientific Process: A View from the Pharmaceutical Industry // PLoS Med. 2016. V. 13(1). e1001936.
3. 'Non-Lethal' Weapons / Ed. By N. Davison. – 2009. 304 p.
4. Chemical Control. Regulation of Incapacitating Chemical Agent Weapons, Riot Control Agents and their Means of Delivery / Ed. by M. Crowley. – 2016. 378 p.
5. OPCW. URL: https://www.opcw.org/about-chemical-weapons/types-of-chemical-agent/nerve-agents/ (дата обращения 24.12.2017).
6. Herbicidal warfare. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Herbicidal_warfare (дата обращения 09.12.2017).
7. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении. Официальный документ ООН и ОРСW (ред. от 29.07.2005). URL: https://www.opcw.org/ fileadmin/OPCW/CWC/CWC_ru.pdf (дата обращения 14.12.2017).
8. W.J. Zhang, F. Jiang, J.F. Ou. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus // Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. 2011. V. 1(2). P. 125-144.
9. M. Roser, H. Ritchie. Fertilizer and Pesticides. Our World in Data. URL: https://ourworldindata.org/fertilizer-and-pesticides/#fertilizer-production (дата обращения 14.12.2017).
10. Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds / Ed. by M. Balali-Mood and M. Abdollahi. – London. Springer-Verlag, 2014. 257 p.
11. B. Madea, F. Mußhoff. Knock-Out Drugs: Their Prevalence, Modes of Action, and Means of Detection // Dtsch Arztebl Int. 2009. V. 106(20). P. 341–7.
12. K. Perry. New spate of attacks by sleeping gas gang, caravanners warned // The Telegraph. 01.09.2014. URL: http://www.telegraph.co.uk/news/uknews/crime/11068184/New-spate-of-attacks-by-sleeping-gas-gang-caravanners-warned.html (дата обращения 14.12.2017).
13. Brad Ringeisen. Battlefield Medicine. URL: https://www.darpa.mil/program/battlefield-medicine (дата обращения 14.12.2017).
14. J. Sanchez. Systems-Based Neurotechnology for Emerging Therapies (DARPA SUBNETS). URL: https://www.darpa.mil/program/systems-based-neurotechnology-for-emerging-therapies (дата обращения 14.12.2017).
15. A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastelli. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery // J. Med. Chem. 2014. V. 57 (19). P. 7874–7887.
16. K. Barnett, S.W. Mercer, M. Norbury, G. Watt. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study // The Lancet. 2012. V. 380. P. 37–43.
17. А.В. Соснов, Ф.М. Семченко, М.И. Власов, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова. Развитие комплексной фармакотерапии сильной и средней боли. Ч. 1. Мультитаргетное комбинирование опиоидов и ненаркотических анальгетиков центрального действия // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. №2 (19). С. 176–187.
18. S.O. Bachurin, E.F. Shevtsova, G.F. Makhaeva et al. Novel conjugates of aminoadamantanes with carbazole derivatives as potential multitarget agents for AD treatment // Scientific Reports. 2017. P. 1–15. URL: http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC5372361&blobtype=pdf (дата обращения 14.12.2017).
19. An Organophosphate Poisoning Antidote Capable of Crossing the Blood-Brain Barrier. UCSD Tech ID: 22601 / UC Case 2012-317-0. URL: https://techtransfer.universityofcalifornia.edu/NCD/22601.html (дата обращения 14.12.2017).
20. Z. Radic, R.K. Sit, Z. Kovarik, S. Berend,E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radic, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, P. Taylor. Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphylated cholinesterases // J Biol Chem. 2012. V. 6 287(15). P. 11798–11809.
21. Patent US 20150361060 A1. Centrally active and orally bioavailable antidotes for organophosphate exposure and methods for making and using them / P. Taylor, Z. Radic, K. Barry. – 2015.
22. J.E. Chambers, E.C. Meek, H.W. Chambers. Novel brain-penetrating oximes for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin and VX surrogates // Ann NY Acad Sci. 2016. V. 1374(1). P. 52–58.
23. Y.J. Rosenberg, L. Mao, X. Jiang, J. Lees, L. Zhang, Z. Radic, P. Taylor. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor // Chem Biol Interact. 2017. V. 25(274). P. 50–57.
24. Opioid Therapy in the 21st Century. Second Edition / Ed. by H.S. Smith. – London: Oxford University Press, 2013. 306 p.
25. A. Kokate, X. Li, B. Jasti. Effect of Drug Lipophilicity and Ionization on Permeability Across the Buccal Mucosa: A Technical Note // AAPS PharmSciTech. 2008. V. 9 (2). P. 501–504.
26. A. Yassen, E. Olofsen, A. Dahan, M. Danhof. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antinociceptive Effect of Buprenorphine and Fentanyl in Rats: Role of Receptor Equilibration Kinetics // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2005. V. 313(3). P. 1136–1149.
27. J. Lotsch. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of Opioids // Journal of Pain and Symptom Management. 2005. V. 29 (5S). P. 90–103.
28. Essentials of Pharmacology for Anesthesia, Pain Medicine, and Critical Care / Ed. by A.D. Kaye and A.M. Kaye. – N.Y.: Springer, 2014. 904 p.
29. A. Andrés, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, S. Espinosa, V. Segarra, J.M. Huerta. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts // Eur J Pharm Sci. 2015. V. 30(76). P. 181–191.
30. LogD Predictor. ChemAxon. URL: https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/ (дата обращения 14.12.2017).
31. M. Danhof. Systems pharmacology – Towards the modeling of network interactions // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016. V. 94. P. 4-14.

URL: http://dx.doi.org/10.1016/ (дата обращения 10.12.2017).

32. Y. Hu, J. Bajorath. Entering the 'big data' era in medicinal chemistry: molecular promiscuity analysis revisited // Future Sci. OA. 2017. V. 3(2). FSO179.

33. Drug Research Advisor. Clarivate Analytics. URL: https://clarivate.com/products/drug-research-advisor/ (дата обращения 14.12.2017).

34. База данных Integrity. URL: https://clarivate.com/training/training-overview-ls/integrity/#quicktabs-live_training_tabs_integrity=2 (дата обращения 14.12.2017).

35. A. Williams, E. Baird. Special Considerations for the Treatment of Pain from Torture and War // Curr Anesthesiol Rep. 2016. V. 6. P. 319–326.

36. J. Breslow, A. Monrow, J. Daly, J. Meissier, J. Gauyhan, M. Alder, T. Eisenstein. Morphine not trauma sensitizes to systemic Acinetobacter baumannii infection // J NeuroImmune Pharmacol. 2011. V. 6(4). P. 551–65.

37. Morphine-Induced Immunosuppression, From Brain to Spleen. NIDA. URL: https://www.drugabuse.gov/news-events/nida-notes/2008/06/morphine-induced-immunosuppression-brain-to-spleen (дата обращения 14.12.2017).

38. P. Sacerdote, S. Franchi, A.E. Panerai. Non-analgesic effects of opioids: mechanisms and potential clinical relevance of opioid-induced immunodepression // Curr Pharm Des. 2012. V. 18(37). P. 6034–42.

39. S. Bimonte, A Barbieri, D. Rea et al. Morphine Promotes Tumor Angiogenesis and Increases Breast Cancer Progression // BioMed Research International. 2015. V. 2015, Article ID 161508. P. 1–8.

40. K. Gupta, S. Kshirsagar, L. Chang et al. Morphine Stimulates Angiogenesis by Activating Proangiogenic and Survivalpromoting Signaling and Promotes Breast Tumor Growth // Cancer Research. 2002. V. 62. P. 4491–4498.

41. А.В. Соснов, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко, К.А. Руфанов, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова, И.А. Тюрин. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 196–206.

42. 2014 TCCC Tactical Combat Casualty Care Guidelines URL: https://www.itstactical.com/medcom/tccc-medcom/2014-tccc-tactical-combat-casualty-care-guidelines/ (дата обращения 14.12.2017).

43. F.K. Butler, R.S. Kotwal, C.C. Buckenmaier. A Triple-Option Analgesia Plan for Tactical Combat Casualty Care: TCCC Guidelines Change 13-04 // Journal of special operations medicine: a peer reviewed journal for SOF medical professionals. 2014. V. 14 (1). P. 13–25.

44. A.D. Fisher, B. Rippee, H. Shehan, C. Conklin, R.L. Mabry. Prehospital analgesia with ketamine for combat wounds: a case series // J Spec Oper Med. 2014. V. 14(4). P. 11–17.

45. A. Eremenko, L. Sorokina. Nefopam, ketoprofen and trimeperidine in analgesia // Annu Meet Eur Soc Anaesthesiol. 2014. Abst 14AP8-6.

46. M.A. Yudin, N.G. Vengerovich, G.S. Sagalov, M.S. Vahvijanen, V.N. Bykov, S.V. Chepur. Changes in Respiratory Function during Treatment with Combination of Analgesic Substances Trimeperidine and Dexmedetomidine // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016. V. 162 (2). P. 215-219.

47. M.S.Cepeda, D.B. Carr. Comparison of Morphine, Ketorolac, and Their Combination for Postoperative Pain. Results from a Large, Randomized, Double-blind Trial // Anesthesiology. 2005. V. 103. P. 1225–32.

48. E. Soleyman-Zomalan, S. Motov, A. Likourezos, V. Cohen, I. Pushkar, C. Fromm. Patterns of Ketorolac dosing by emergency physicians // World J Emerg Med. 2017. V. 8 (1). P. 43–46.

49. J.R. Fricke, D. Angelocci, K. Fox, D. McHugh, L. Bynum, J.P. Yee. Comparison of the efficacy and safety of ketorolac and meperidine in the relief of dental pain // J Clin Pharmacol. 1992. V. 32(4). P. 376–84.

50. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 70н от 15 февраля 2013 г. «Об утверждении требований к комплектации лекарственными препаратами и медицинскими изделиями комплекта индивидуального медицинского гражданской защиты для оказания первичной медико-санитарной помощи и первой помощи». URL: http://www.mchs.gov.ru/document/446399 (дата обращения 14.12.2017).

51. Abuse-Deterrent Opioids – Evaluation and Labeling. Guidance for Industry / Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2015. 26 p.

52. Н.Г. Венгерович, М.А. Юдин, А.С. Никифоров, Г.С. Сагалов, Э.А. Рузанова, Н.В. Шперлинг, А.И. Венгеровский, И.А. Шперлинг, А.С. Макачеев. Влияние комбинации фентанила и дексмедетомидина на функции внешнего дыхания при острой кровопотере // Бюллетень сибирской медицины. 2017. V. 16(2). P. 96–104.

53. I.K. Khanna, S. Pillarisetti. Buprenorphine – an attractive opioid with underutilized potential in treatment of chronic pain // Journal of Pain Research. 2015. V. 8. P. 859–870.

54. C. Martin, A. De Baerdemaeker, J. Poelaert, A. Madder, R. Hoogenboom, S. Ballet. Controlled-release of opioids for improved pain management // Materials Today. V. 19, Number 9. 2016. P. 491–502.

55. D.A. Volpe, G.A. McMahon Tobin, R.D. Mellon, A.G. Katki, R.J. Parker, T. Colatsky, T.J. Kropp, S. Leigh Verbois. Uniform assessment and ranking of opioid Mu receptor binding constants for selected opioid drugs // Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2011. V. 59. P. 385–390.

56. B. Zhang, T. Zhang, A.W. Sromek, T. Scrimale, J.M. Bidlack, J.L. Neumeyer. Synthesis and binding affinity of novel mono- and bivalent morphinan ligands for κ, μ, and δ opioid receptors // Bioorg Med Chem. 2011. V. 19(9). P. 2808–2816.

57. L.E. Mather. Opioids: a pharmacologist's delight // Clin Exp Pharmacol Physiol. 1995. V. 22. P. 833–836.

58. F. Medzihradsky, P.J. Emmerson, C.A. Mousigian. Lipophilicity of Opioids Determined by a Novel Micromethod // JPM. 1992. V. 27 (2). P. 67–69.

59. DrugBank database. URL: https://www.drugbank.ca/drugs (дата обращения 24.12.2017).

60. Small Animal Toxicology / Ed. by M.E. Peterson, P.A. Talcott. – 2006. 1190 p.

61. J.W. Mandema, D.R. Stanski. Population pharmacodynamic model for ketorolac analgesia // Clin Pharmacol Ther. 1996. V. 60(6). P. 619–35.

62. Critical review of Ketamine 34th ECDD 2006/4.3. URL: https://www.drugbank.ca/unearth/q?utf8=%E2%9C%93&searcher=drugs&query=mu-Opioid+Receptor+Agonists (дата обращения 26.12.2017).

63. E. Bostro, M. Hammarlund-Udenaes, U.S.H. Simonsson. Blood–Brain Barrier Transport Helps to Explain Discrepancies in In Vivo Potency between Oxycodone and Morphine // Anesthesiology. 2008. V. 108. P. 495–505.

64. J.K. Coller, L.L. Christrup, A.A. Somogyi. Role of active metabolites in the use of opioids // Eur J Clin Pharmacol. 2009. V. 65(2). P. 121–39.

65. J. Cory Kalvass, E.R. Olson, M.P. Cassidy, D.E. Selley, G.M. Pollack. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Seven Opioids in P-Glycoprotein-Competent Mice: Assessment of Unbound Brain EC_{50}, and Correlation of in Vitro, Preclinical, and Clinical Data // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2007. V. 323(1). P. 346–355.

66. P.P. Palmer. Efficacy and Safety of Sublingual Sufentanil 30 mcg for the Management of Acute Pain Following Ambulatory Surgery. AcelRx Pharmaceuticals. 2016.

67. S. Belli, F. Assmus, B. Wagner, M. Honer, H. Fischer, F. Schuler, R. Alvarez-Sánchez. Estimation of Drug Binding to Brain Tissue: Methodology and in Vivo Application of a Distribution Assay in Brain Polar Lipids // Mol. Pharmaceutics. 2015. V. 12(12). P. 4529–4541.

68. S. Beni, G. Toth, B. Noszal, S. Hosztafi. Preparation of benzoate esters of morphine and its derivatives // Monatsh Chem. 2012. V. 143(10). P. 1431–1440.

69. Patent US 2017143839. Benzoic acid, benzoic acid derivatives and heteroaryl carboxylic acid conjugates of hydromorphone, prodrugs, methods of making and use thereof / T. Mickle, S. Guenther, G. Chi, J. Kanski, A.K. Martin, B. Bera. – 2017.

70. K. McWilliams, M. Fallon. Fast-acting fentanyl preparations and pain management // Q J Med. 2013. V. 106. P. 887–890.

71. Fentanyl Transdermal System (marketed as Duragesic) Information / FDA. URL: https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm114961.htm (дата обращения 26.12.2017).

72. J.C. Scott, J.E. Cooke, D.R. Stanski. Electroencephalographic quantitation of opioid effect: comparative pharmacodynamics of fentanyl and sufentanil // Anesthesiol. 1991. V. 74. P. 34–42.

73. T.-J. Gan, P.P. Palmer, M.A. Royal. Sublingual Sufentanil, an "Ideal" Opioid for Acute and Breakthrough Pain: The Clinical Importance of CST½ and t½ke0. Poster presentation at the American Pain Society 2014 meeting. 2014. URL: http://www.acelrx.com/technology/publications/arx-04/2014%20APS%20Optimizing%20PK%20Poster%20Final%204%2022%2014.pdf (дата обращения 26.12.2017).

74. C. Metz, L. Gobel, M. Gruber, K.H. Hoerauf, K. Taeger. Pharmacokinetics of Human Cerebral Opioid Extraction. A Comparative Study on Sufentanil, Fentanyl, and Alfentanil in a Patient after Severe Head Injury // Anesthesiology. 2000. V. 92. P. 1559–67.

75. H.S. Minkowitz, D.Leiman, T. Melson, N. Singla, K.P. Di Donato, P.P. Palmer. Sufentanil Sublingual Tablet 30 mcg for the Management of Pain Following Abdominal Surgery: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase-3 Study // Pain Practice. 2017. V. 17(7). P. 848–858.

76. M. Evashenk. Phase 3 Efficacy and Safety Results of the Sufentanil Sublingual Tablet 30 mcg (DSUVIA™). 2017. SOMSA Plenary Session.

77. H. Minkowitz, N. Singla, T. Melson, D. Leiman, K. Di Donato, P. Palmer. Safety and Efficacy of Sufentanil Sublingual 30mcg Tablets by Surgery Type for the Treatment of Acute Pain Following Outpatient Abdominal Surgery. 2016. SOMSA.

78. H.S. Minkowitz, N.K. Singla, M.A. Evashenk, S.S. Hwang, Yu-Kun Chiang, L.G. Hamel, P.P. Palmer. Pharmacokinetics of Sublingual Sufentanil Tablets and Efficacy and Safety in the Management of Postoperative Pain // Regional Anesthesia and Pain Medicine. 2013. V. 38 (2). P. 131–139.

79. Report of the International Narcotics Control Board on the Availability of Internationally Controlled Drugs: Ensuring Adequate Access for Medical and Scientific Purposes. UN. International Narcotics Control Board. 2010. URL: https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2010/Supplement-AR10_availability_English.pdf (дата обращения 26.12.2017).

80. А.В. Соснов, С.С. Голубев, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова. Оценка потребности Российской Федерации в сильнодействующих анальгетиках // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 202–215.

81. A.K. Chan, C. W. Cheung, Y.K. Chong. Alpha-2 agonists in acute pain management // Expert Opin Pharmacother. 2010. V. 11(17). P. 2849–68.

82. J.A. Giovannitti, S.M. Thoms, J.J. Crawford. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications // Anesth Prog. 2015. V. 62(1). P. 31–38.

83. D.D. Price, D.J. Mayer, J. Mao, F.S. Caruso. NMDA-receptor antagonists and opioid receptor interactions as related to anal¬gesia and tolerance // J Pain Symptom Manage. 2000. V. 19(1). P. 7–11.

84. K. Subramaniam, B. Subramaniam, R. Steinbrook. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review // Anesth Analg. 2004. V. 99(2). P. 482-95.

85. D. Jamero, A. Borghol et al. The Emerging Role of NMDA Antagonists in Pain Management // U.S. Pharmacist. 2001. V. 36(5). P. 4–8. URL: https://www.uspharmacist.com/article/the-emerging-role-of-nmda-antagonists-in-pain-management (дата обращения 02.12.2017).

86. C.S. Bonnet, A.S. Williams et al. AMPA/kainate glutamate receptors contribute to inflammation, degeneration and pain related behaviour in inflammatory stages of arthritis // Ann Rheum Dis. 2015. V. 74(1). P. 242–251.

87. D.R. Kirkpatrick et al. Transmission pathways and mediators as the basis for clinical pharmacology of pain // Expert Rev Clin Pharmacol. 2016. V. 4. P. 1–25.

88. A Study to Evaluate the Clinical Efficacy, Safety and Tolerability of ARX-F03 Sublingual Sufentanil/Triazolam Nano-Tab™ in Patients Undergoing an Elective Abdominal Liposuction Procedure // ClinicalTrials. AcelRx Pharmaceuticals, Inc. URL: https://clinicaltrials.gov/show/NCT00894699 (дата обращения 02.12.2017).

89. D. Perret, Z.D. Luo. Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management // Neurotherapeutics. 2009. V. 6(4). P. 679–92.

90. S. Goyal et al. Comparison of the Effects of Zonisamide, Ethosuximide and Pregabalin in the Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain in

Rats // Ann Med Health Sci Res. 2015. V. 5(3). P. 189–96.

91. J.A. Fidler, Y.A. Jamal et al. GABA antagonist, delays return of righting reflex in mice after isoflurane anesthesia but does not significantly alter dendritic spine density // 46th Annu Meet Soc Neurosci. San Diego. 2016. Abst. 343.20.

92. P. Compton, P. Kehoe, K. Sinha. Gabapentin improves cold-pressor pain res-ponses in methadone-maintained patients // Drug Alcohol Depend. 2010. V. 109(1–3). P. 213–9.

93. N. Stoicea, D. Russell, G. Weidner, M. Durda, S.D. Bergese. Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin // Front Pharmacol. 2015. V. 27. P. 96–104.

94. D.L. Cichewicz. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics // Life Sci. 2004. V. 74(11). P. 1317–1324.

95. J. Elikkottil, P. Gupta, K. Gupta. The analgesic potential of cannabinoids // J Opioid Manag. 2009. V. 5(6). P. 341–357.

96. L.R. Gerak, C.P. France. Combined Treatment with Morphine and Δ9-Tetrahydrocannabinol in Rhesus Monkeys: Antinociceptive Tolerance and Withdrawal // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2016. V. 357(2). P. 357–366.

97. D.R. Maguire, C.P. France. Interactions between cannabinoid receptor agonists and mu opioid receptor agonists in rhesus monkeys discriminating fentanyl // Eur J Pharmacol. 2016. V. 5(784). P. 199–206.

98. D.R. Maguire, C.P. France. Impact of efficacy at the μ-opioid receptor on antinociceptive effects of combinations of μ-opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists // J Pharmacol Exp Ther. 2014. V. 351(2). P. 383–389.

99. F. Shen, P.R. Tsuruda, J.A. Smith, G.P. Obedencio, W.J. Martin. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model // PLoS One. 2013. V. 8(9). P. 74891.

100. M.L. Banks, K.C. Rice, S.S. Negus. Antinociceptive interactions between Mu-opioid receptor agonists and the serotonin uptake inhibitor clomipramine in rhesus monkeys: role of Mu agonist efficacy // J Pharmacol Exp Ther. 2010. V. 335(2). P. 497–505.

101. J.X. Li, W. Koek, K.C. Rice, C.P. France. Effects of direct- and indirect-acting serotonin receptor agonists on the antinociceptive and discriminative stimulus effects of morphine in rhesus monkeys // Neuropsychopharmacology. 2011. V. 36(5). P. 940–949.

102. K. Di Donato, P.P. Palmer, T.E. Morris, J. Walker, M. Casamayor, M. Hennebert. Intravenous administration of morphine in the emergency room inflicts a substantial economic burden in the EU5. Poster PSY45. ISPOR 19th Annual European Congress. 2016.

103. S.L. Kane-Gill. The cost of opioid-related adverse drug events // Journal of pain & palliative care pharmacotherapy. 2014. V. 28(3). P. 282–293.

104. H. Smith. A Comprehensive Review of Rapid-Onset Opioids for Breakthrough Pain // CNS Drugs. 2012. V. 26(6). P. 509–535.

105. N.M.L. Veldhorst-Janssen, A.A.A. Fiddelers, P.-H.M. van der Kuy, C. Neef, M.A.E. Marcus. A Review of the Clinical Pharmacokinetics of Opioids, Benzodiazepines, and Antimigraine Drugs Delivered Intranasally // Clinical Therapeutics. 2009. V. 31 (12). P. 2954–2987.

106. Oral ALLOD-2 vs. Its Components & vs. Placebo in the Acute Treatment of Migraine (ANODYNE-1). NCT03061734. 2017. URL: https://clinicaltrials.gov/show/NCT03061734 (дата обращения 10.12.2017).

107. L. Gorecki, J. Korabecny, K. Musilek, E. Nepovimova, D. Malinak, T. Kucera, R. Dolezal, D. Jun, O. Soukup, K. Kuca. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006-2016) // Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2017. V. 27(9).

108. А.В. Соснов, М.И. Власов, С.В. Садовников, К.А. Руфанов, Ф.М. Семченко, А.А. Соснова, А.С. Радилов, Е.И. Савельева. Методы обнаружения токсикантов с использованием люминесцентных реагентов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 4(21). С. 108–125.

109. W.J. Geldenhuys, A.S. Mohammad, C.E. Adkins, P.R. Lockman. Molecular determinants of blood–brain barrier permeation // Ther. Deliv. 2015. V. 6(7). P. 961–971.

110. О.И. Рудько, Е.А. Климов, В.В. Соболев, А.В. Соснов, К.А. Руфанов, Ф.М. Семченко. Исследование влияния интраназального введения препарата дексмедетомидин на болевую чувствительность // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2 (19). С. 236–241.

111. V.N. Tohmahchi, M.S. Krymchak, A.I. Korovyakovskaya, F.M. Semchenko, A.V. Sosnov. Transdermal therapeutic systems for benzodiazepines // 250th American Chemical Society National Meeting. 2015. Poster.

112. И.Н. Станьков, В.Б. Кондратьев, И.Д. Деревягина, П.В. Казаков, О.И. Лукашов, О.Т. Морозова, Ф.М. Семченко, А.В. Соснов. Газохроматографическое определение микроколичеств эпибатидина и его биомаркера в плазме крови // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. № 2. С. 189–195.

113. А.В. Соснов, С.С. Голубев, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Е.М. Загребин, И.С. Родина, Ф.М. Семченко, А.А. Соснова. Стандартные образцы контролируемых сильнодействующих компонентов препаратов анальгетиков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 216–223.

114. А.В. Соснов, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко. Разработка и выпуск стандартных образцов контролируемых биологически активных веществ ограниченного использования // II-я Международная научная конференция «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». 2015.

115. Федеральный закон от 08.01.1998 № 3-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «О наркотических средствах и психотропных веществах» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017). URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_17437/ (дата обращения 02.12.2017).

116. Федеральный закон от 26.06.2008 № 102-ФЗ (ред. от 13.07.2015) «Об обеспечении единства измерений». URL: http://docs.cntd.ru/document/902107146 (дата обращения 14.12.2017).

117. Е.В. Осинцева. Тенденции и перспективы развития номенклатуры стандартных образцов в РФ // Материалы II-й Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». 2015.

УДК 615.07

СОВРЕМЕННЫЕ ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ^{68}GA

О.А. Мельникова[1]*, Д.Н. Муратов[2], А.Ф. Ситников[2], Е.В. Шориков[2], Д.Ю. Кобесова[2]

Резюме. Метод функциональной диагностики (сцинтиграфия), заключающийся во введении в организм человека радиоактивных изотопов и получении в дальнейшем двумерного изображения путем испускаемого излучения, нашел широкое распространение в медицине. Сцинтиграфическая визуализация инфекции и воспаления с ^{68}Ga-цитратом является прекрасным и мощным диагностическим инструментом в лечении пациентов с инфекционными или воспалительными заболеваниями. ^{68}Ga – это коротко живущий позитрон-излучающий радионуклид (период полураспада 67,6 мин, позитронная энергия 2,92 МэВ). Такие характеристики позволяют получать лучшие качества изображения других известных радиофармпрепаратов галлия. В настоящей статье описывается синтез радиофармпрепартов на основе ^{68}Ga. Описывается преимущество данных препаратов, механизм распада материнского радионуклида. Рассматривается установка для синтеза ^{68}Ga-цитрата и все происходящие технологические процессы. Полученный цитрат ^{68}Ga является подходящим для использования в ПЭТ-диагностике при выявлении инфекционных или воспалительных заболеваний в обычной клинической практике.

Ключевые слова: радиофармпрепараты, установка синтеза ^{68}Ga-цитрата, радиохимический синтез.

MODERN ISSUES OF ORGANIZING RADIO PHARM PREPARATIONS PRODUCTION BASED ON ^{68}GA

O.A. Melnikova[1]*, D.N. Muratov[2], A.F. Sitnikov[2], E.V. Shorikov[2], D.Yu. Kobesova[2]

Abstract. Functional diagnostics method (scintigraphy), connected with injection of radioactive isotopes with further getting of 2-D image by emitting radiation detection, is widely used in medicine. Scintigraphic visualization of infections and inflammation with ^{68}Ga-citrate is powerful diagnostic instrument for patients with inflammation or infection disease. ^{68}Ga is short-lived positron emitting radionuclide (half-life time is 67,6 min, positron energy is 2,92 MeV). Such characteristics allowed to get better images of other radiopharmaceuticals with 68 Ga. Benefits of the drugs, mechanism of mother radionuclide fission is described in the article, as well as equipment for ^{68}Ga-citrate synthesis with all the technological processes. Obtained ^{68}Ga-citrate is suitable for positron emission tomography diagnostics for infection disease and inflammation detection in clinical practice.

Keywords: radiopharmaceuticals, ^{68}Ga-citrate synthesis unit, radiochemical synthesis.

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

2 – ООО «ПЭТ-технолоджи», 620905, Россия, г. Екатеринбург, ул. Соболева, д. 29, стр. 8

1 – Ural State Medical University, 3, Repin str., Ekaterinburg, 620028, Russia

2 – LLC «PET-Technology», 29/8, Soboleva str., Yekaterinburg, 620905, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: newfarmacia@mail.ru
Тел.: 8 (343) 214 86 71

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время метод позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) становится ключевой технологией в диагностике онкологии. Широко используются в ПЭТ радиофармпрепараты (РФП), содержащие ^{18}F. Однако их применение требует циклотрона – сложной и дорогостоящей современной техники, что не всегда возможно для развивающейся ПЭТ. Радиоизотопы ^{68}Ga в этом случае являются хорошей перспективой. Интересно, что изначально ^{68}Ga был первым из изотопов, используемых в ПЭТ, и благодаря легкости получения по достоинству оценено при диагностике [1].

Широкое применение нашли такие РФП, как ^{68}Ga-этилендиаминтетрауксусная кислота и ^{68}Ga-цитрат. Данная статья будет посвящена последнему, поскольку цитрат ^{68}Ga имеет улучшенное пространственное строение в сравнении с известными препаратами галлия-67 и отличается высоким и воспроизводимым радиохимическим процессом с использованием коммерческого модуля маркировки ^{68}Ga.

В настоящее время есть два способа получения радионуклида ^{68}Ga: с помощью циклотрона – облучением твердотельной цинковой мишени с образованием ^{68}Ga. Реакция ^{68}Zn+p=^{68}Ga+2n.

Второй – это генераторный, когда материнский радионуклид ^{68}Ge распадается путём 100% электронного захвата.

Производство РФП галлия цитрата ^{68}Ga инъекционного раствора осуществляется с помощью ^{68}Ge/^{68}Ga и генератора. ^{68}Ge имеет длительный период полураспада ($T_{1/2}$=270,95 дней) до ^{68}Ga с периодом полураспада ($T_{1/2}$=67,71 мин) и идеально подходит для радиофармацевтического синтеза.

В настоящее время на рынке лидирует генератор Ge-68/Ga-68. Линейный ускоритель протонов пропускает свой пучок на материнский радионуклид Ge-68, где происходят реакции сначала 100% электронного захвата и превращения до Ga-68.

Существует также множество генераторов с различными матрицами и элюэнтами. В качестве матрицы можно использовать неорганические оксиды, такие как Al_2O_3 или ZrO_2, которые фиксируют на колонке ^{68}Ga. В качестве элюэнта можно использовать раствор ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), натрия оксалат, в качестве матрицы – Al_2O_3 и Sb_2O_5.

Также в разных генераторах могут быть предложены в качестве матрицы Al_2O_3 или $Fe(OH)_3$, элюэнта – HCl, ZrO_2 или SiO_2 и HNO_3, SnO_2 и 1 М HCl, CaO_2 и 0,02 М HCl. Широко используются и различные полимерные смолы с использованием 5,5 М HCl в качестве элюента. Высокий выход ^{68}Ga 80% дает макропористый органический полимер на основе N-метилглюкаминовых групп в качестве адсорбента для ^{68}Ge и при элюировании с 0,1 М тринатрия цитратом.

Некоторые поставщики разработали автоматизированные модули для удаления примесей ^{68}Ge и для очистки элюата от примесей металлов [2].

При радиохимическом синтезе возможно возникновение примесей ^{65}Zn и остаточных количеств ^{68}Ge, поэтому в генераторах используют отделение путём хроматографического элюирования. В качестве сорбента может быть использован модифицированный диоксид титана, оксид алюминия, анионообменные смолы. Получаемый вначале родительский радионуклид ^{68}Ge закрепляют в колонке сорбента и помещают в свинцовый контейнер.

Затем колонку снабжают элюентом и элюатом. Ga-68, который образуется в результате распада Ge-68, элюируется из колонки, например, 0,1 М HCl.

Целью данной работы была разработка технологии синтеза ^{68}Ga-цитрата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и реактивы

Натрия цитрат (ГОСТ 22280-76), лимонная кислота (ГОСТ 3652-69), раствор соляной кислоты 0,1 моль/л, метанол (ГОСТ 6995-77), катионит AG 50W-X8, картриджи с катионообменником и большим размером пор (300Å) типа Sep-Pak ACCELL, пластины для тонкослойной хроматографии типа Sorbfil (ТУ 4215-002-43636866-2007), фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Оборудование

Генератор 68Ge/68Ga производства ЗАО «Циклотрон» (Обнинск, Россия) (ТУ 95 821-06) с номинальной активностью германия-68 в генераторе 1,1 ГБк ($T_{1/2}$ ^{68}Ge и ^{68}Ga 270,8 дней и 67,6 мин соответственно).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс синтеза можно описать с помощью схемы, представленной на рисунке 1.

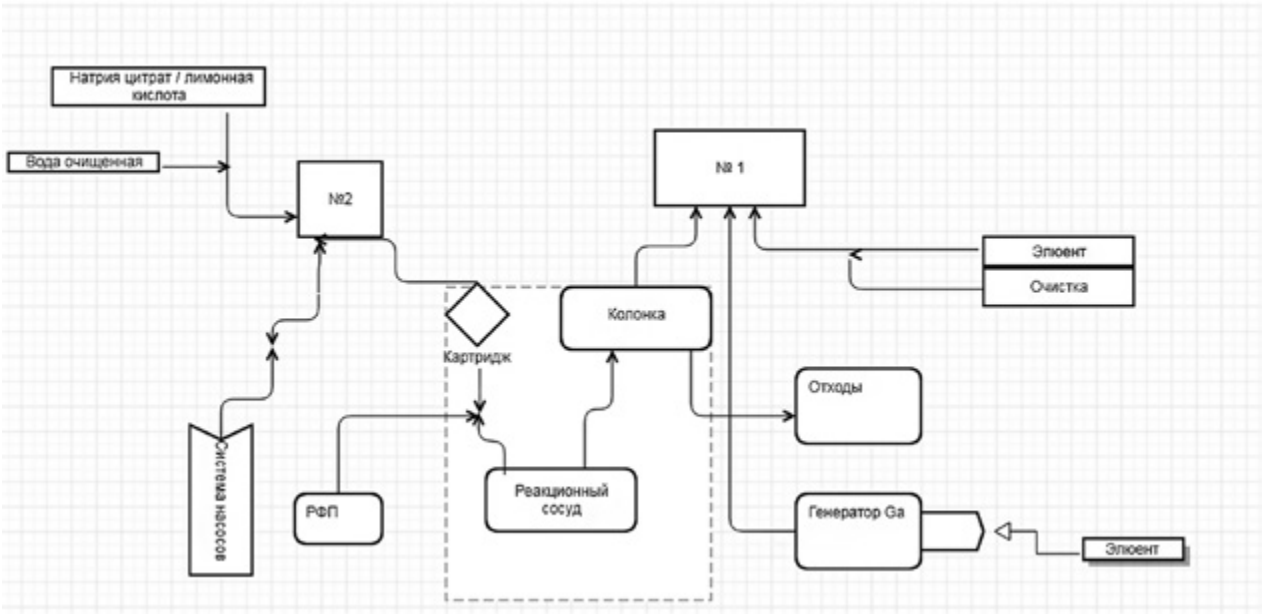


Рисунок 1. Схема установки синтеза ^{68}Ga-цитрата

Перед началом производства все трубки и клапаны промывают 10 мл 95% этанола, высушивают потоком воздуха, затем 10 мл стерильной воды, высушивают. Данная подготовка необходима, чтобы избежать бактериального и пирогенного загрязнения.

Генератор элюируют 9 мл 0,1 н раствора соляной кислоты. Элюат пропускают через колонку с катионообменной смолой. Колонку промывают специальным промывочным раствором (концентрация соляной кислоты 0,15 моль/л в смеси ацетона и воды в соотношении 80/20%). Данная процедура необходима для удаления примесей тяжелых металлов Zn, Fe и остаточных следов ^{68}Ge.

После переключения клапана № 1 в колонку попадает фракция ^{68}Ga которая элюируется 0,4 мл соляной кислоты с концентрацией 0,05 моль/л смесью ацетона и воды в соотношении 98/2%. В реакционном сосуде должно находиться 4 мл стерильной воды. Растворитель из сосуда удаляют путём инкубирования в течение 5 мин.

Затем ^{68}Ga-картридж-колонку активируют водой для инъекций (2 мл). Картридж за счёт большого размера пор аналита собирает отходы производства во флакон для отходов. На данном этапе используется система насосов.

Затем поворотом клапана № 2 открываем путь к флакону из РФП, и ^{68}Ga, удерживаемый колонкой-картриджем, элюируем 1 мл натрия цитрата с концентрацией 0,085 моль/л в смеси с лимонной кислотой с концентрацией 0,078 моль/л. Полученный раствор стерилизуют фильтрованием через фильтр с размерами пор 0,22 мкм, который окончательно промывают 3 мл воды для инъекций.

Для контроля качества полученного раствора РФП проводят измерение pH раствора (pH=5,0). Радиохимическую чистоту определяют методом тонкослойной хроматографии. Для этого наносят 10–20 мкл радиофармпрепарата на расстоянии 3 см от края полоски хроматографической бумаги 3х55 см. Пока пятна влажные, их немедленно хроматографируют методом восходящей хроматографии до отметки в 14 см, используя систему растворителей, состоящую из смеси 1,36 г ацетата натрия и 0,58 мл ледяной уксусной кислоты на каждые 100 МЛ воды (можно также в качестве системы растворителей использовать метанол и ледяную уксусную кислоту). После того как полоска частично подсохла, её покрывают чистой плёнкой, определяют распределение радиоактивности, сканируя хроматограмму с помощью подходящего детектора излучения: радиохимическая чистота должна составлять не менее 95,0% общей радиоактивности. Данный показатель фиксируется при измерении по уровню растворителя (значение R_f равно или более 0,9) или значение R_f ^{68}Ga равно 0, а значение R_f ^{68}Ga-цитрата равно 1.

Качество РФП также контролируют по показателю «радионуклидная подлинность». Гамма-лучевой спектр в этом случае должен быть идентичен спектру образца ^{67}Ga чистого. Возможно проявление фотопиков с энергией 93,3; 184,6; 300,2 кэВ.

Раствор РФП должен удовлетворять требованиям, связанным с микробиологической чистотой, быть стерильным и свободным от эндотоксинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генераторная система ^{68}Ge/^{68}Ga с таким вариантом синтеза может стать современным способом получения ^{68}Ga-меченых ПЭТ-трассеров для повседневной практики в ядерной медицине, поскольку является менее затратной по сравнению с обычными методами. Данный метод является более дешевым, одного синтеза хватает как минимум на двух пациентов.

Активность на фильтре в конце синтеза составила 1,2±2,5%. После промывания колонки раствором 0,1 моль/л соляной кислоты активность фильтрата составила 15,8±4,5% от общей активности.

Для анализа качества был использован метод тонкослойной хроматографии, который является более простым и удобным в сравнении с методом ВЭЖХ и более распространен в лабораториях, изготавливающих радионуклидные препараты для ПЭТ. Все партии показали значение pH в необходимых пределах – pH=5±1,2, прошли испытания на стерильность и дали отрицательный тест на пирогеность. Радиохимический выход был достаточно высоким и составлял 63,5±1,2%, что доказывает надежность изготовления данного лекарственного препарата и дальнейшего его использования в клинических исследованиях ПЭТ. Метод дает хорошо воспроизводимые результаты

С клинической точки зрения использования в ПЭТ-диагностике цитрат ^{68}Ga имеет преимущество, поскольку обладает небольшим периодом полураспада и позволяет завершить процесс в течение 1,5 ч, тогда как обычный цитрат ^{67}Ga требует не менее 48 ч поглощения и прихода пациента на диагностику уже не один, а два раза.

В заключение работы необходимо отметить, что авторы надеются, что описанный метод получения и анализа качества радиофармпрепарата ^{68}Ga-цитрата будет использован достаточно широко для ПЭТ-диагностики пациентов с хроническим и острым остеомиелитом, саркаидозом, аденомой предстательной железы и другими воспалительными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Лунёв, О.Е. Клементьева, А.А. Ларенков, К.А. Петросова, М.В. Жукова, Г.Е. Кодина. Экспериментальная оценка возможности применения радиофармацевтического препарата ^{68}Ga-цитрат для ПЭТ-визуализации воспалений // Саратовский научно-медицинский журнал. 2014. Т. 10. № 4. С. 776–781.
2. А.А. Ларенков, А.Б. Брускин, Г.Е. Кодина. Радионуклиды галлия в ядерной медицине: радиофармацевтические препараты на основе изотопа ^{68}Ga // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2011. Т. 56 (№ 5). С. 56–73.

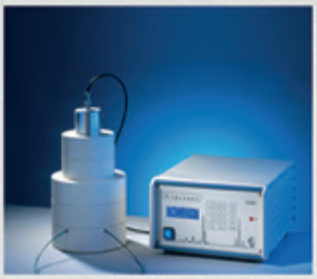
raytest

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ Elysia-Raytest ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Бельгийская компания Elysia–Raytest представляет для лабораторий контроля качества радиофармпрепаратов ПЭТ–центров варианты решения таких исследовательских задач, как проверка радиохимической и радионуклидной чистоты РФП:

Детектор гамма-радиоактивности GABI Star, интегрируемый в ВЭЖХ-систему, для проверки радиохимической чистоты





- 2 канала одновременного счёта с 2-мя задаваемыми порогами энергии
- считает количество радиационных событий в энергетическом канале в выбранном интервале времени
- детектирует до 600 000 импульсов в секунду

ПО GINA Star контролирует систему ВЭЖХ в целом, что позволяет проводить контроль качества РФП в соотвествии с требованиями GMP и GLP

Проточный ВЭЖХ-детектор бета-радиоактивности RAMONA Star для проверки радиохимической чистоты

- детектирование низко- и высокоэнергетического бета-, гамма- и черенковского излучения
- фотоэлектронные умножители с фотокатодом 2"-ого диаметра гарантируют высокую чувствительность и низкий уровень фона







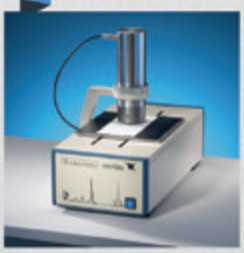




RAMONA Star может быть укомплектована различными ячейками:

- ***трубчатой*** для определения бета-минус нуклидов (3H с наибольшей чувствительностью) и регистрации черенковского излучения. Для прокачки жидкого сцинтиллятора RAMONA Star дополнительно оснащается насосом
- ***ячейка с внутренним твердым сцинтиллятором*** для детектирования низкоэнергетических бета-излучателей (14C)
- ***ячейки с внешними твердыми сцинтилляторами*** для высокоэнергетических бета и гамма-эмиттеров

Сканер для тонкослойной хроматографии miniGITA Star для подтверждения радиохимической чистоты



miniGITA Star - сканирующее устройство, в котором столик для образцов перемещается относительно детектора радиоактивности:

- автоматическая коррекция на радиоактивный распад изотопа за период сканирования
- повторяющаяся непрерывная регистрация радиоактивного сигнала вдоль одного следа от линии старта до линии фронта и в обратном направлении

Многоканальный гамма-спектрометр MUCHA Star для проверки радионуклидной чистоты радиофармпрепаратов



- определение присутствия нуклидов в пробах, взятых из окружающей среды: воды, отходов или продуктах питания
- автоматическая калибровка по энергии с помощью калибровочного источника ^{137}Cs

ГК «Фармконтракт» - эксклюзивный дистрибьютор бельгийской компании Elysia-Raytest

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

www.phct-group.com

info@phct-group.com

УДК 615.273.53; 547.587.51

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КЕТО-КЕТАЛЬНЫХ ИЗОМЕРОВ ВАРФАРИНА СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

А.З. Абышев[1], К.Б. Нгуен[1]*, Л.Н. Зинчук[1]

Резюме. В результате проведённых исследований было показано, что соотношение изомеров при интегрировании в ДМСО-d_6 (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью составляют 70:28:2%; в $CDCl_3$ – 45:40:15%. В ИК-спектрах варфарина наблюдаются специфичные полосы поглощения в областях 3271–3277 $см^{-1}$, 1681–1682 $см^{-1}$, 1103–1076 $см^{-1}$, сответствующие νOH, νCH=CH: ν_{as} C–O–C. Молекулярный пик варфарина после силирования имеет m/z 380, соответствующий массе триметилсилил-варфарина. Таким образом, показана возможность применения ИК-, ЯМР-спектроскопии и хромато-масс-спектрометрии для подтверждения подлинности производных варфарина.

Ключевые слова: варфарин, кето-кетальные изомеры, ИК-, ЯМР-спектроскопия, ГХ-МС.

ANALYSIS OF STRUCTURAL FEATURES OF THE KETO-KETAL ISOMERS OF WARFARIN BY SPECTRAL METHODS

A.Z. Abyshev[1], K.B. Nguyen[1], L.N. Zinchuk[1]

Abstract. As a result of the studies was shown that the relative ratios of isomers by integration in DMSO-d_6: (S, R)-warfarin – (S, S)-warfarin –open chain warfarin are 70%: 28%: 2%; in $CDCl_3$ are 45%: 40%: 15%. In the IR spectra of warfarin specific absorption bands are observed in the regions 3271–3277 cm^{-1}, 1681–1682 cm^{-1}, 1103–1076 cm^{-1}, corresponding to:νOH, νCH=CH: ν_{as} C–O–C. The molecular peak of warfarin after silylation has m/z 380 corresponding to the mass of trimethylsilyl-warfarin. Thus, the possibility of using IR, NMR spectroscopy and chromatography-mass spectrometry to confirm the authenticity of warfarin derivatives has been demonstrated.

Keywords: warfarin, keto-ketal isomers, IR, NMR spectroscopy, GC-MC.

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 and Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Варфарин (4-гидрокси-3-(3-оксо-1-фенилбутил)-2H-1-бензопиран-2-он) представляет собой антикоагулянтное лекарственное средство, обычно используемое для профилактики и лечении венозных тромбозов и тромбоэмболизмов. Варфарин снижает коагуляцию крови путем ингибирования активного сайта зависимой от витамина К эпоксидредуктазы (VKOR) [1]. Несмотря на давнее и широкое использование варфарина в качестве лекарственного средства, механизм его действия до сих пор не совсем ясен. Возможным фактором, влияющим на известную сложность оптимизации дозы, которая была связана с биодоступностью варфарина [2], может быть сложность варфарина на молекулярном уровне [3, 4]. Важным моментом, который будет способствовать более глубокому пониманию функции варфарина как лекарственного средства, является идентификация точной молекулярной структуры биологически активной формы варфарина.

Варфарин может теоретически существовать в 40 различных таутомерных формах (рисунок 1). Варфарин демонстрирует прототропную таутомерию, внутримолекулярное движение водорода от одного атома к другому, а также таутомерию с кольцевой цепью, где движение протона сопровождается открытием или закрытием кольца [3, 4].

Все формы варфарина с открытой цепью проявляют кето-енольную таутомерию как в β-кетолактонном фрагменте, так и в кетогруппе боковой цепи. Каждая из этих частей может существовать в любой из трех таутомерных форм. Однако поскольку β-кетолактонный фрагмент имеет хиральный центр, на самом деле существует два возможных диастереомера, что приводит к четырем различным возможностям. При использовании кетогруппы боковой цепи одна форма енола, содержащая концевую метильную группу, имеет два возможных изомера: E- и Z-конфигурации. Это создает четыре различные

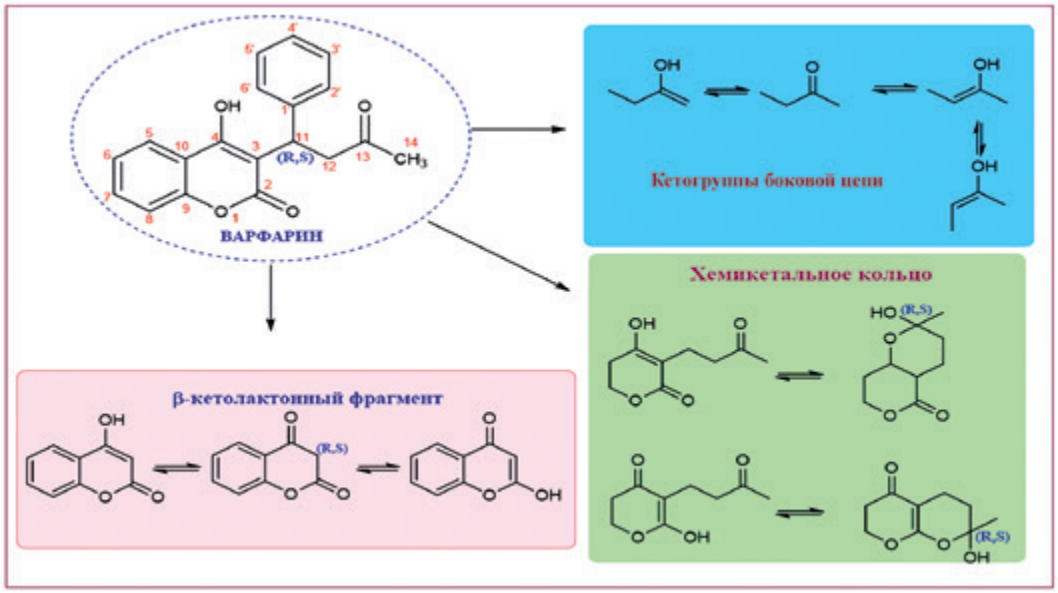


Рисунок 1. Таутомеризация подструктур варфарина, комбинация которых составляет 40 различных таутомерных форм варфарина

формы для таутомеризации кетонов боковой цепи. Комбинация обоих фрагментов дает 16 различных таутомеров с открытой цепью (рисунок 1) [3].

Форма с открытой цепью близка к образованию циклического гемикеталя 4-гидроксикумарина или циклического гемикеталя 2-гидроксихромона. Закрытие кольца создает новый центр асимметрии, поэтому для каждого закрытия могут образовываться два возможных диастереомера – в общей сложности четыре различных таутомеров кольца (рисунки 1, 2) [2–5].

В качестве одного из наиболее эффективных антикоагулянтов варфарин был введен для клинического применения состав препаратов Варфарин®, Янтовен®, Униварфин®, Кумадин®, Мареван® в виде рацемата [6]. Однако активность и метаболизм обеих энантиомерных форм неодинаковы. Было доказано, что (S)-варфарин в четыре раза более активен, чем (R)-варфарин, и, по-видимому, доминирует в реакции антикоагулянтов на терапию [5, 7]. Период полураспада (S)-варфарина в два-четыре раза меньше, чем у R-варфарина, так что менее активный энантиомер

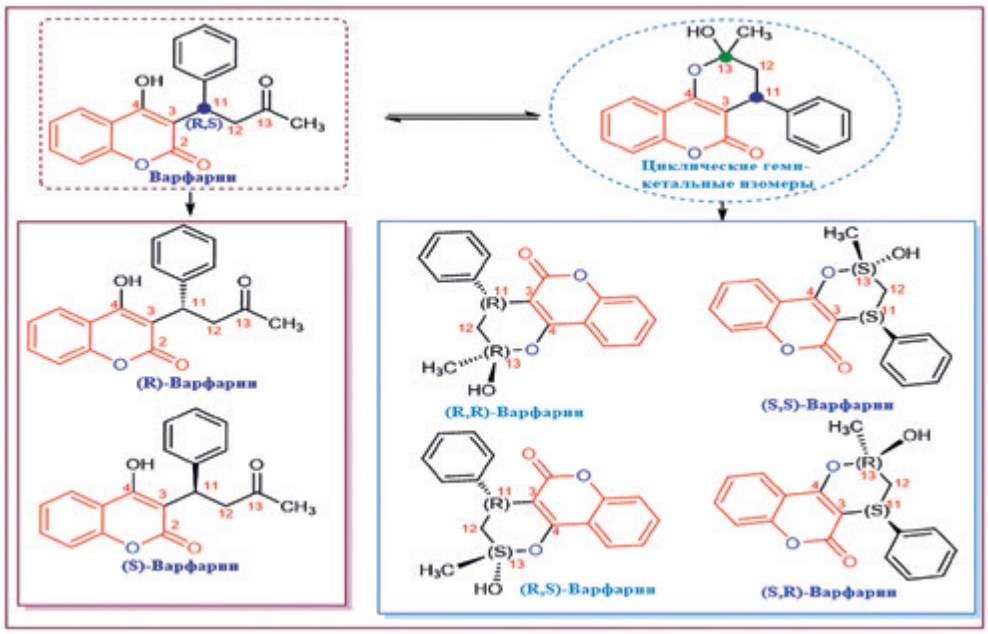


Рисунок 2. Кето-кетальные изомерия варфарина

накапливается и, возможно, способствует антикоагулянтному ответу [8]. Поэтому при химической модификации структуры варфарина в различных условиях очень важно определение принадлежности (конфигурации) полученного искомого соединения к ряду R- или S-изомеров современными физико-химическими методами.

Целью нашей работы явился анализ структурных особенностей кето-кетальных изомеров варфарина спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия и хромато-масс-спектрометрия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали варфарин (CAS № 81-81-2, Aldrich Chemical, США); регистрировались ИК-спектры веществ в виде паст в вазелиновом масле, дисков с KBr на фурье-спектрофотометре инфракрасном ФСМ-1201 (ЗАО «СПБ Инструментс», Россия).

^{1}H-ЯМР- и ^{13}C-ЯМР-спектры были получены с помощью спектрометра Bruker Avance III 400 MHz (Bruker, США) с ТМС (тетраметилсилан-$SiMe_4$) в качестве внутреннего стандарта, и химические сдвиги регистрировали в м.д. по δ-шкале с использованием ДМСО-d_6 или $CDCl_3$ в качестве растворителя.

ГХ-МС-хроматограммы были сняты на газовом хроматографе Agilent 7820 GC System (Agilent Technologies, США), оснащенном масс-селективным квадрупольным детектором Agilent Series MSD (Agilent Technologies, США), на неполярной капиллярной колонке Agilent 19091S-433 HP-5MS (Agilent Technologies, США). Анализ проводили после силирования с помощью N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 1% триметилхлоросилана (Sigma-Aldrich, США), в сухом термоблоке при 110 °С в течение 15 мин.



Газовый хроматограф Agilent Technologies 7820 GC System, оснащенный масс-селективным квадрупольным детектором Agilent Series MSD

ИК- и ЯМР-спектры были обработаны с помощью программы FSpec 4.0 (ООО «Мониторинг», Россия) и ACD/SpecManager 10.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Канада).

ГХ-МС-хроматограммы были обработаны программой UniChrom 5.0 (New Analytical Systems Ltd., Белоруссия) и ACD/SpecManager 10.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Канада).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 3 представлены ^{13}C-ЯМР-спектры варфарина (в ДМСО-d_6). Из данных спектров видно явное дублирование пиков с очень похожими химическими сдвигами, а соответствующие пары интенсивностей имеют одинаковое соотношение (1:2,5) для всех пиков. Это указывает на то, что образец варфарина содержит по меньшей мере два таутомера, которые очень похожи друг на друга, потому что их химические сдвиги по углеродным атомам одинаковы.

Последний сигнал в высокочастотном диапазоне появляется при 161,18 м.д. Отсутствует сигнал для карбонильного углерода из CH_2-CO-CH_3-фрагмента открытой формы, который ожидался при ~200 м.д. Это подтверждает, что таутомеры должны быть закрытыми. Следует отметить, что дублирование пиков происходит из-за присутствия диастереомера циклического гемикеталя 4-гидроксикумарина. Кроме того, имеется множество пиков, интенсивность которых близка к базовой линии при 30,37 м.д. (C-14), 49,39 м.д. (C-13), 108,15 м.д (C-12) и 195,62 м.д. (C=O из CH_2-CO-CH_3-фрагмента), соответствующих другому таутомеру варфарина – второстепенному компоненту с открытой цепью (в относительном соотношении (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью 70:28:2% при интегрировании).

Анализ спектров ^{13}C-ЯМР варфарина в растворе $CDCl_3$ показывает, что в растворе, кроме диастереомера циклического гемикеталя 4-гидроксикумарина, также присутствует форма с открытой цепью (в относительном соотношении (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью 45:40:15% при интегрировании) (рисунок 4). Полное отнесение сигналов в спектрах ^{13}C-ЯМР варфарина приведено в таблице 1.

Для интерпретации спектра ПМР (рисунки 5, 6) мы сосредоточились на неароматических водородах, которые наиболее полезны для дифференциации таутомеров. Необходимо отметить, что водород в положении H-14 метильной группы проявляется в виде синглета при δ~1,58–1,70 м.д., более интенсивный сигнал обусловлен изомером (S,R)-варфарина, а сигнал меньшей интенсивности – изомером (S,S)-варфарина и варфарина с открытой цепью (в растворе $CDCl_3$).

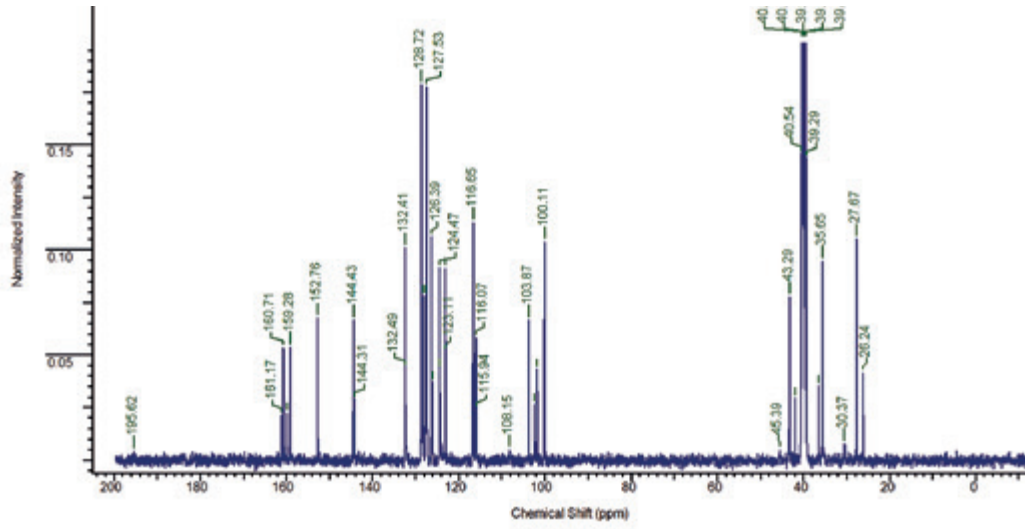


Рисунок 3. Спектр ^{13}C-ЯМР варфарина (ДМСО-d_6, 100 МГц)

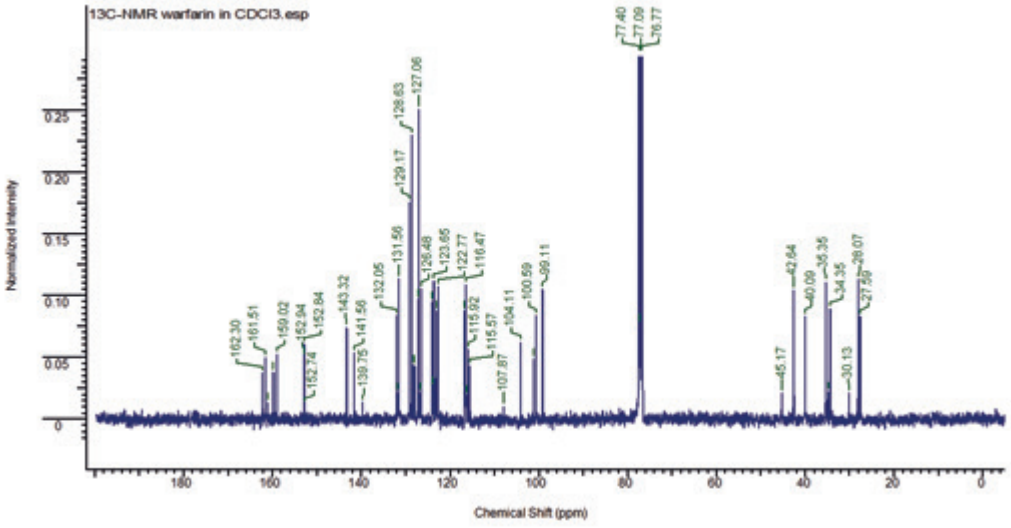


Рисунок 4. Спектр ^{13}C-ЯМР варфарина ($CDCl_3$, 100 МГц)

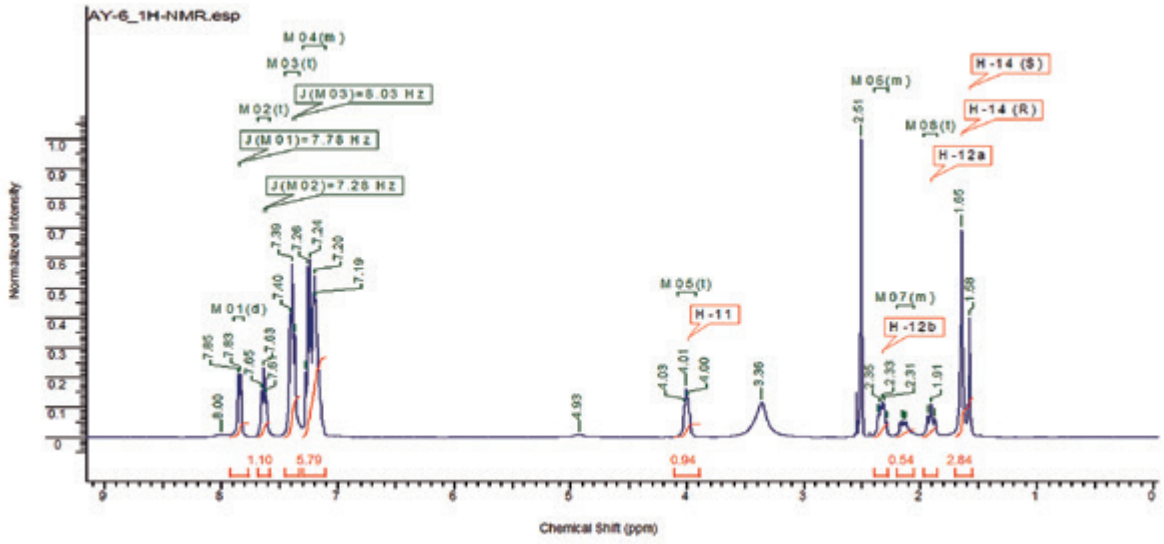


Рисунок 5. Спектр ^{1}H-ЯМР варфарина (ДМСО-d_6, 400 МГц)

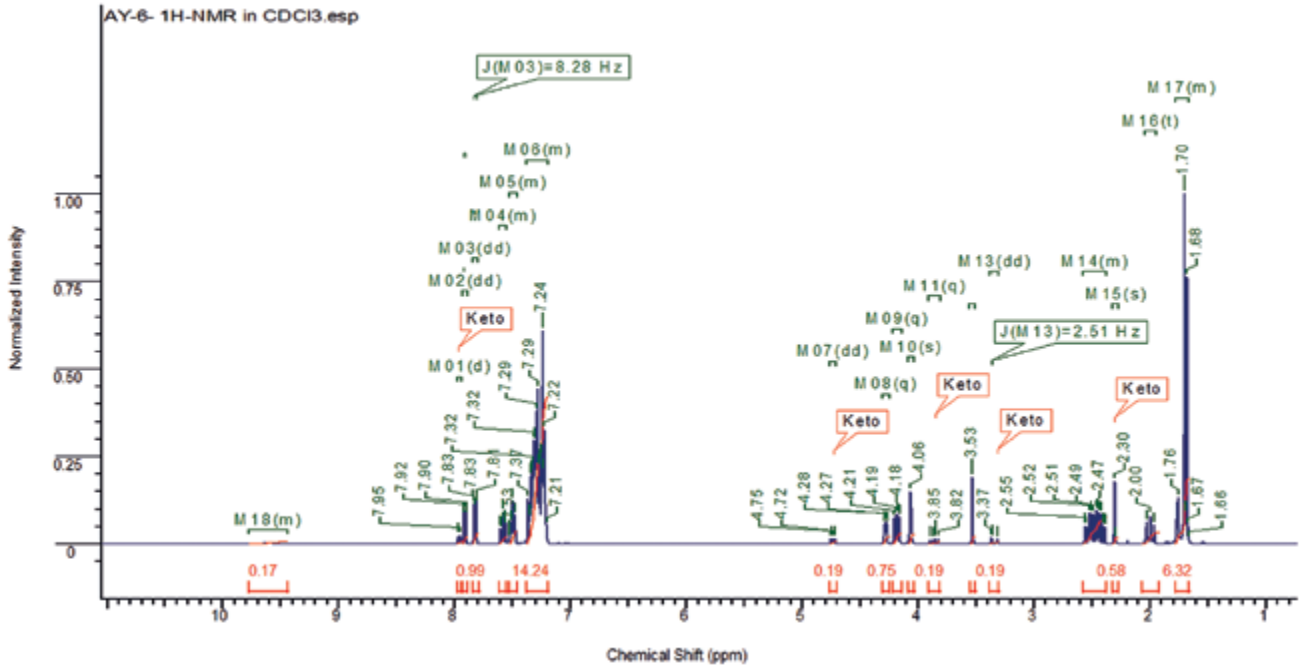


Рисунок 6. Спектр ^{1}H-ЯМР варфарина ($CDCl_3$, 400 МГц)

Таблица 1.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР кето-кетальных изомеров варфарина

Кето-кетальные изомеры варфарина		 (S,S)-Варфарин		 (S,R)-Варфарин		 Варфарин	
Положение	*Тип углеродов*	*^{13}C- ЯМР δ (м.д., 100 МГц)*					
		DMSO-d_6	$CDCl_3$	DMSO-d_6	$CDCl_3$	DMSO-d_6	$CDCl_3$
C-14	CH_3	26,24	27,59	27,67	28,07	30,07	30,13
C-11	CH	36,49	34,35	35,65	35,35	–	34,83
C-12	CH_2	41,98	40,09	43,29	42,64	45,39	45,17
C-13	C	101,85	100,59	100,11	99,11	195,62	–
C-3	C	102,39	101,20	103,87	104,11	108,15	107,87
C-8	CH	115,94	115,57	116,07	115,92	–	–
C-10	C	116,72	116,65	116,65	116,47	–	116,20
C-5	CH	123,11	123,09	123,17	122,77	–	–
C-6	CH	124,53	123,98	124,47	123,65	–	123,89
C-4′	CH	126,11	126,48	126,39	127,01	–	126,70
C-3′, C-5′	CH	127,76	127,16	127,53	127,06	–	127,99
C-2′, C-6′	CH	128,34	129,17	128,72	128,63	–	128,19
C-7	CH	132,49	132,05	132,41	131,56	–	131,82
C-1′	C	144,43	141,56	144,31	143,32	–	139,75
C-9	C	152,76	152,74	152,76	152,84	–	152,94
C-2	C	159,88	159,02	159,28	159,82	–	–
C-4	C	161,17	162,30	160,71	161,51	–	161,09
^{1}H- NMR δ (м.д., 400 МГц)							
H-14	CH_3	1,58 (с)	1,68 (с)	1,66 (с)	1,70 (с)	–	1,76 (с)
H-12$_a$	CH_2	2,22 (уш.с.)	2,01(т)	1,90 (уш.с.)	2,30 (м.)	2,14	3,34 (дд)
H-12$_b$	CH_2	2,33 (уш.с.)	2,40–2,56 (м.)	2,35 (уш.с)	2,40–2,56 (м.)		3,87 (кв.)
H-11	CH	4,01 (уш.с.)	4,28 (м.)	4,01 (уш.с.)	4,18 (м.)	4,94	4,74 (дд)

Сигнал H-12$_a$ и H-12$_b$ CH_2-группы для циклических гемикетальных изомеров варфарина имеет δ~1,90–2,30 м.д. и δ~2,33–2,56 м.д. соответственно в виде уширенного триплета или мультиплета; для варфарина с открытой цепью – δ~3,34 м.д. и δ~3.87 м.д. соответственно в виде дублета или квадруплета.

Сигнал H-11 CH-группы имеет δ=4,01 м.д. в виде уширенного триплета для двух изомеров. Сигналы H-11 для варфарина с открытой цепью проявляются очень малой интенсивностью при δ~4,94 м.д. (в ДМСО-d_6) и 4,74 м.д. (в $CDCl_3$) соответственно. Отнесение сигналов неароматических водородов в спектрах ^{1}H-ЯМР кето-кетальных изомеров варфарина приведено в таблице 1.

Результаты анализа ИК-спектров (рисунки 7–8) показывают, что варфарин существует в виде циклических гемикетальных изомеров и открытой цепи. В ИК-спектрах присутствует полосы поглощения в области 3271–3277 см$^{-1}$, характерные для спиртовой гидроксильной группы; полоса поглощения при 1681–1682 см$^{-1}$, характерная для C=O-пирана кумаринового ядра; полоса поглощения CH=CH α-пиранов при 1608–1618 см$^{-1}$; полоса поглощения CH_3-группы при 2955–2957 см$^{-1}$; полосы поглощения при 1103,32 и 1076,31 см$^{-1}$, характерные для кетальной группы C-O-C.

Полное отнесение полос поглощения в ИК-спектрах варфарина приведено в таблице 2.

Масс-спектр варфарина в нашей работе был получен после силирования с помощью бис(триметилсилил)трифторацетамида в пиридине в течение 15 мин. Молекулярный пик данного соединения имеет *m/z* 380 (рисунок 9), соответствующий массе триметилсилил-варфарина. Наиболее важные пути фрагментации структуры данного соединения показаны на рисунке 10.

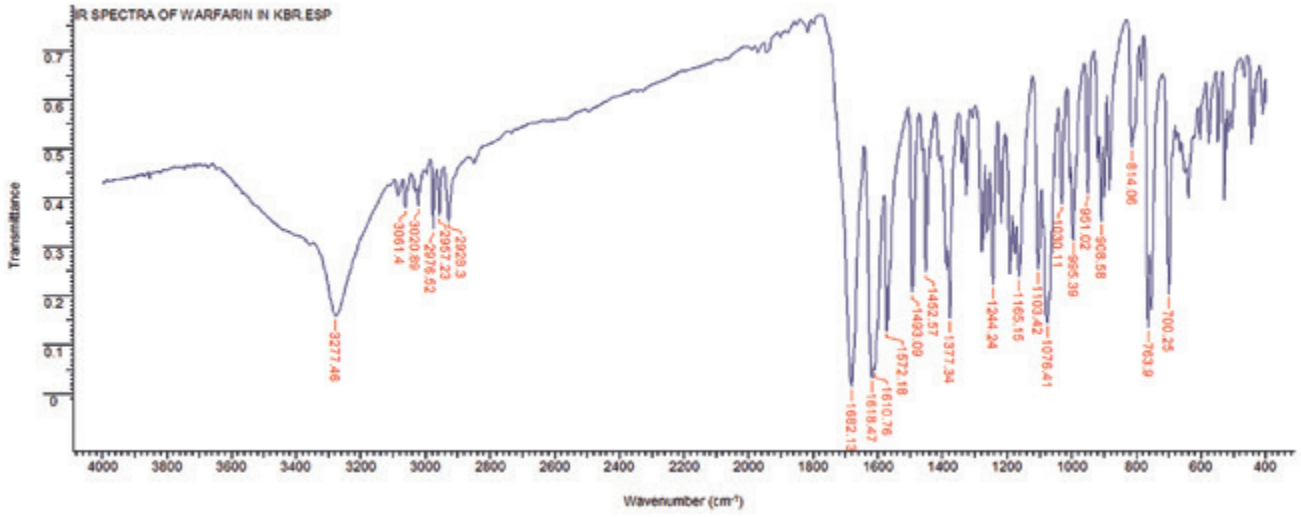


Рисунок 7. **ИК-спектр варфарина в KBr в области 4000–400 см$^{-1}$**

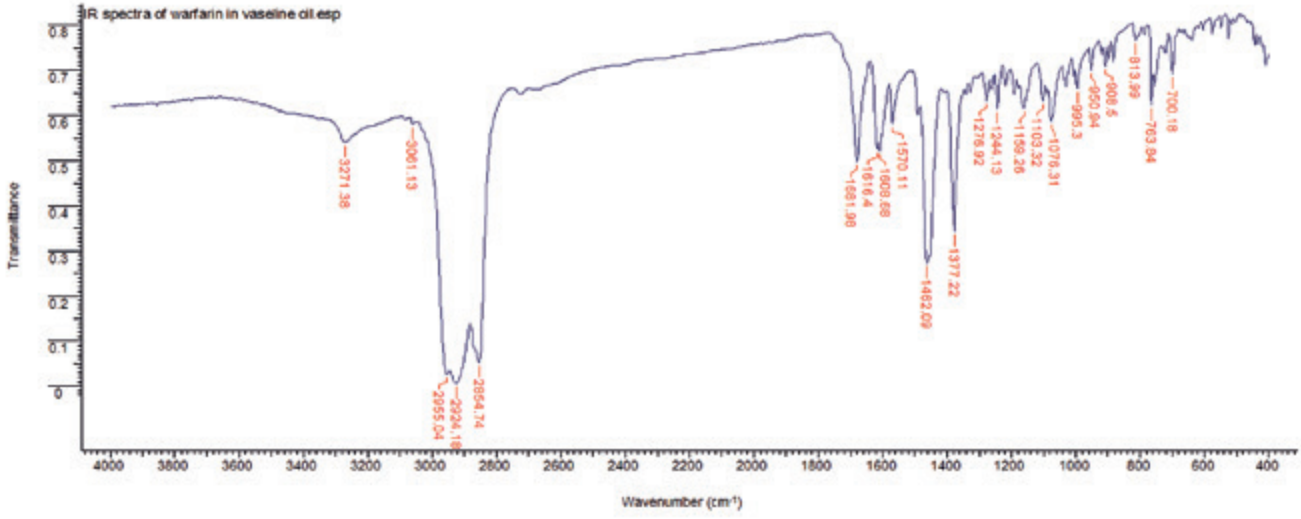


Рисунок 8. **ИК-спектр варфарина в вазелиновом масле в области 4000–400 см$^{-1}$**

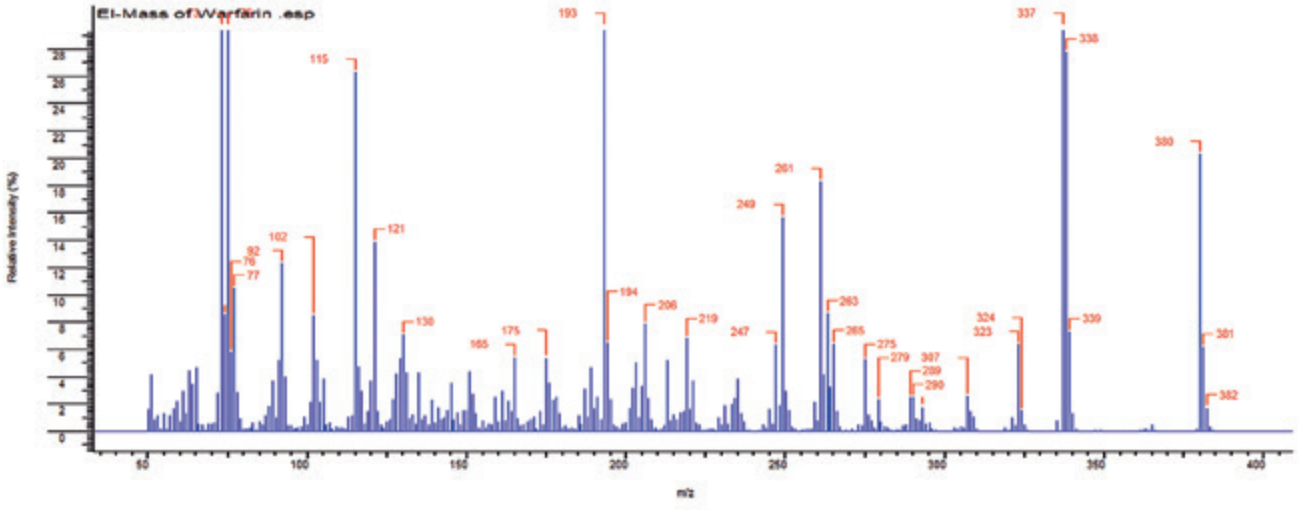


Рисунок 9. ЭИ-масс-спектр варфарина

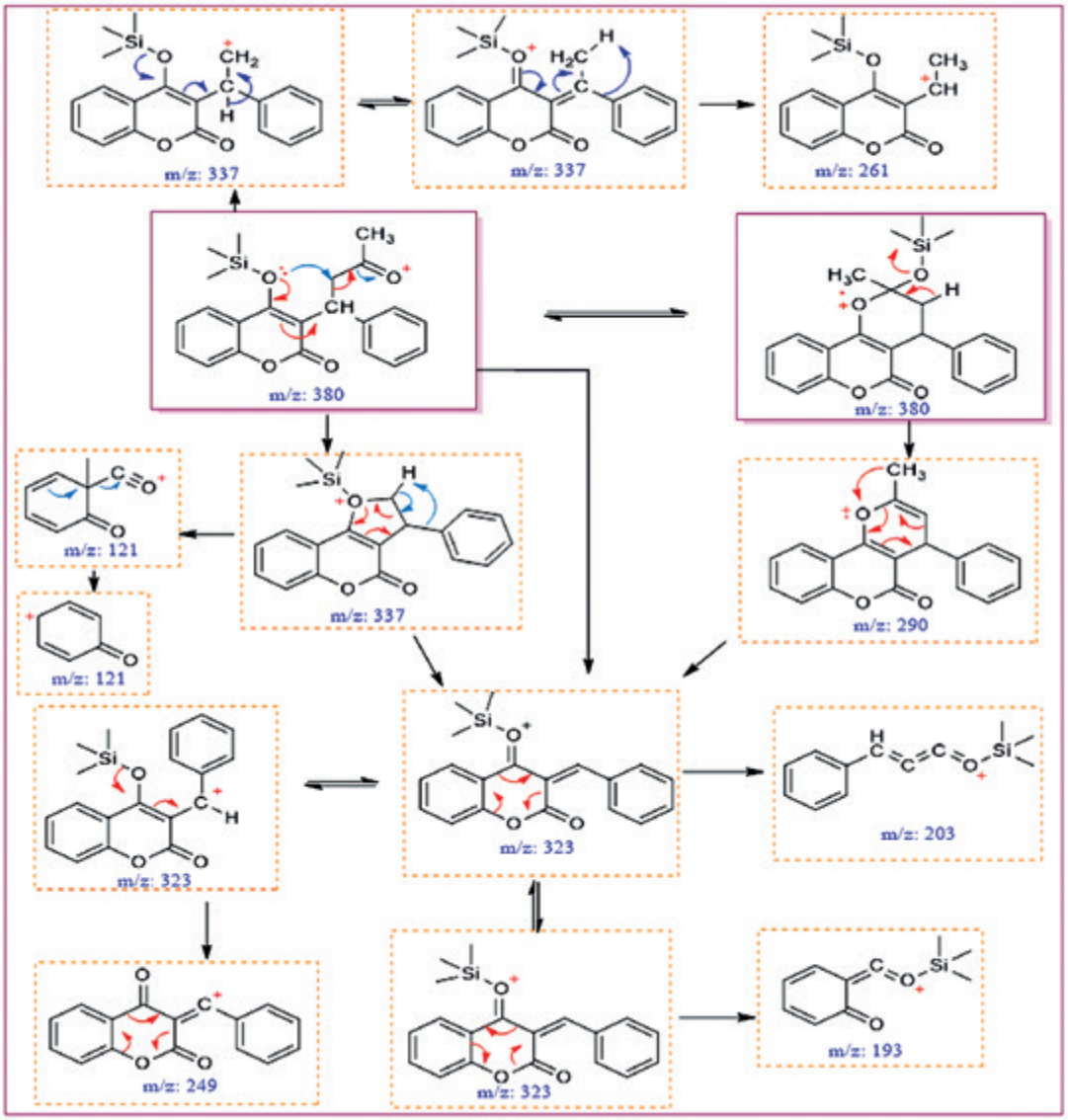


Рисунок 10. Основные фрагменты в ЭИ-масс-спектре варфарина после силирования

Таблица 2.

Отнесение полосы поглощения в ИК-спектрах варфарина

Волновое число ($см^{-1}$)		Функциональная группа, тип колебания
KBr	В вазелиновом масле	
3277,46 (с.)	3271,38 (ср.)	O-H, валентное
3061,4 (ср.)	3061,13 (сл.)	CH=CH бензолового цикла, валентное
2976,52 (ср.)		CH_3, асимметричное, валентное
2957,23 (ср.)	2955,04 (оч.с.)	CH_3, симметричное, валентное
2928,3 (ср.)	2924,21 (оч.с.), 2852,84	sp^2 CH_2, валентное
1682,13 (оч.с.)	1681,98 (ср.)	C=O α-пирона (в кумариновом ядре), валентное
1618,47 (оч.с.), 1610,76 (оч.с.)	1616,4 (ср.), 1608,68 (ср.)	CH=CHα-пирона, валентное
1572,18 (с.)	1570,11 (сл.)	CH=CH бензолового цикла в кумариновом ядре, валентное
1493,09 (с.)		CH, валентное
1452,57 (с.)	1462,09 (с.)	sp^2 CH_2, симметричное деформационное
1377,34 (с.), 1327,19 (ср.)	1377,22 (ср.)	CH_3, симметричное деформационное
1278,96 (с.), 1244,24 (с.), 1192,15 (с.)	1276,92 (сл.), 1244,13 (сл.)	C=O-O (связь «карбонил – кислород» в α-пиронах), валентное
1165,15 (с.)	1159,26 (сл.)	C-O (связь «спиртовой углерод – кислород» в α-пиронах), валентное
1103,42 (с.), 1076,41 (с.), 1030,11 (ср.)	1103,32 (сл.), 1076,31 (сл.)	C-O-C, кеталь, асимметричное, валентное
995,39 (с.), 908,58 (ср.), 814,06 (ср.)	995,3 (сл.),908,5(сл.), 813,99 (оч.сл.)	CH=CH, деформационное
763,9 (с.), 754,26 (с.), 700,25 (с.),	763,84 (сл.), 700,18 (сл.)	sp^3 CH_2, деформационное (качание)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам данной работы было установлено, что варфарин существует в динамическом равновесии между различными изомерными формами; распределение и типы изомеров, присутствующих в растворе, зависят от полярности и pH растворителя. Также показано, что варфарин в растворе состоит из трех взаимоконвертируемых таутомерных структур, две из которых представляют собой циклические диастереомерные гемикетали – (S,S)-варфарин и (S,R)-варфарин, третий, второстепенный, компонент представляет собой промежуточную форму с открытой цепью; соотношение изомеров при интегрировании в ДМСО-d_6 (S,R)-варфарин – (S,S)-варфарин – варфарин с открытой цепью составляют 70:28:2%; в $CDCl_3$ – 45:40:15%. В ИК-спектрах варфарина наблюдаются специфичные полосы поглощения в областях 3271–3277 $см^{-1}$, 1681–1682 $см^{-1}$, 1103–1076 $см^{-1}$, сответствующие νOH, νCH=CH: ν_{as} C-O-C. Молекулярный пик варфарина после силирования имеет m/z 380, соответствующий массе триметилсилил-варфарина.

Поэтому в настоящее время для индентификации (определения подлинности) таутомеров варфарина наиболее объективными методами являются именно спектральные методы, в частности ИК- и ЯМР-спектроскопия и хромато-масс-спектрометрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и снтетические кумарины и флавоноиды. – Баку: Наука и образование, 2014. 482 с.
2. M. Wadelius et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose // The pharmacogenomics journal. 2005. V. 5. № 4. P. 262–270.
3. L. Guasch, M.L. Peach, M.C. Nicklaus. Tautomerism of warfarin: combined chemoinformatics, quantum chemical, and NMR investigation // The Journal of organic chemistry. 2015. V. 80. № 20. P. 9900–9909.
4. E.J. Valente et al. Structure of warfarin in solution // Journal of medicinal chemistry. 1977. V. 20. № 11. P. 1489–1493.
5. D.A. Barnette et al. Stereospecific Metabolism of R-and S-Warfarin by Human Hepatic Cytosolic Reductases // Drug Metabolism and Disposition. 2017. V. 45. № 9. P. 1000–1007.
6. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th Edition / Ed. by S.C. Sweetman. – London: Pharmaceutical Press, 2009. 3694 p.
7. M. He et al. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9 // Archives of biochemistry and biophysics. 1999. V. 372. № 1. P. 16–28.
8. M.J. Fasco, L.M. Principe. R-and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2, 3-epoxide reductase activities in the rat // Journal of Biological Chemistry. 1982. V. 257. № 9. P. 4894–4901.

УДК 615.322; 612.111.15; 612.117.5

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ТЕРПЕНОИНДОЛЬНЫМИ АЛКАЛОИДАМИ

О.В. Тринеева[1]*, А.Д. Халахакун[1], А.И. Сливкин[1], Е.Е. Чупандина[1]

Резюме. Изучены морфологические и физико-химические свойства эритроцитов, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами (ТИА), методами нефелометрии и осмотической резистентности эритроцитов в среде с низкими концентрациями хлорида натрия. Исследованы изменения морфологических и физико-химических параметров у ТИА-загруженных эритроцитарных носителей и свежеизолированных эритроцитов. Установлено, что при процессе инкапсулирования ТИА модифицированным методом гипотонического набухания морфологические и физико-химические параметры эритроцитов незначительно изменяются по сравнению с контролем.

Ключевые слова: эритроцитарные носители, терпеноиндольные алкалоиды, нефелометрия, рефрактометрия, адресные системы доставки лекарственных средств.

MORPHOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE CARRIERS INCAPULATED BY TERPINEINDOLIC ALKALOIDS

O.V. Trineeva[1]*, A.J. Halahakoon[1], A.I. Slivkin[1], E.E. Chupandina[1]

Abstract. Morphological and physico-chemical properties of erythrocytes encapsulated by terpenoindol alkaloids (TIA) by nephelometry and osmotic resistance of erythrocytes in a medium with low concentrations of sodium chloride have been studied. Changes in the morphological and physico-chemical parameters of TIA-loaded erythrocyte carriers and freshly isolated erythrocytes have been studied. It was found that during the process of encapsulation of TIA by a modified hypotonic swelling method, the morphological and physicochemical parameters of erythrocytes change insignificantly in comparison with the control.

Keywords: erythrocyte carriers, terpenoindol alkaloids, nephelometry, refractometry, targeted drug delivery systems.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1

1 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya sq., Voronezh, 394006, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: trineevaov@mail.ru
Тел.: 8 (473) 253 07 89

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ведущих тенденций, появившихся в современной фармакологии, является создание систем направленного транспорта лекарств. Среди потенциальных носителей лекарственных веществ особое место занимают форменные элементы крови (эритроциты), в которые при определенных условиях может быть инкапсулирована достаточно высокая доза препаратов без заметного повреждения клетки [1–4]. К достоинствам эритроцитов как транспортной формы лекарств относятся идеальная биосовместимость (при использовании аутологичных клеток), отсутствие токсических продуктов деградации, длительность обращения в кровотоке, доступность в препаративном количестве. При внутривенном введении препаратов в составе эритроцитарных «контейнеров» могут быть достигнуты как увеличение времени циркуляции лекарства, так и его преимущественная доставка в органы и ткани ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). Большой интерес вызывает возможность использования эритроцитов в качестве носителей ТИА-препаратов в целях уменьшения их побочных эффектов.

В процессе инкапсулирования эритроцитов соответствующие фармакологические вещества могут повреждать целостность эритроцитов. Сильно поврежденные эритроциты могут быстро элиминировать из кровотока с участием макрофагов в РЭС. Известны примеры успешного экспериментального получения и клинического использования эритроцитарных носителей (ЭН) различных классов лекарственных средств (антибиотиков, противоопухолевых препаратов, ферментов и др.) [5, 6]. Однако недостаточно изученными остаются вопросы влияния экстракорпорального насыщения препаратами эритроцитов на морфологические и функциональные свойства клеток. Эффективность эритроцитов в качестве носителя прямо зависит от степени по-

вреждения морфологических и физико-химических свойств после их инкапсуляции эритроцитов. Результаты исследований в этом направлении могут способствовать уточнению механизмов взаимодействия ТИА с эритроцитами в условиях обработки клеток *in vitro*, позволяя прогнозировать поведение эритроцитов-переносчиков в организме.

Целью настоящей работы являлась оценка морфологических и физико-химических свойств эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве клеточной модели для исследований на мембранном уровне использовались свежеизолированные человеческие эритроциты и ТИА инкапсулированные эритроцитарные формы. В качестве ТИА-препаратов применяли винкристина сульфат (VCR) и винбластина сульфат (VBL), которые соответствовали требованиям частных фармакопейных статей государственных фармакопей (ГФ): США – UPS 30-NF25 («VINBLASTINE SULFATE FOR INJECTION», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINBLASTINE SULFATE», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINCRISTINE SULFATE FOR INJECTION», PF 32(5), Pg. 1470, USP Reference standards; «VINCRISTINE SULFATE», PF 32(5), Pg. 1470); Европы – EPh. 8 («VINCRISTINE SULFATE», Pg. 3536; «VINBLASTINE SULFATE», Pg. 3535); Японии – J.Ph. XVII («VINCRISTINE SULFATE», Pg. 1764; «VINBLASTINE SULFATE», Pg. 1762); Британии – BPh 2013. Были использованы следующие препараты: «Винкристин-Тева» – раствор для внутривенного введения 2 мг/2 мл [рег. № П N015355/01 от 18.09.08, Teva Pharmaceutical Industries (Израиль) / PHARMACHEMIE (Нидерланды)]; «Веро-винкристин», раствор для внутривенного введения 1мг/2 мл [рег. № P N002383/01-2003 от 02.04.08, «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия)]; «Винкристин-Рихтер», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 1 мг; (код EAN: 5997001358955; рег. № П N014883/01, 2008-06-11); «Винбластин-ЛЭНС», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 5 мг [рег. № P N000203/01 от 18.08.06, «ЛЭНС-ФАРМ» (Россия), дочерняя компания «ВЕРОФАРМ» (Россия)].

Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VBL использовали модифицированный метод гипоосмотического лизиса. Объектами исследования служили эритроциты крови, полученные от здоровых доноров с соблюдением всех мер безопасности, под наблюдением медицинских специалистов. Эритроциты выделяли центрифугированием (центрифуга ЦЛН-2 и ОПН-8, Россия) при 3000 об/мин в течение 5 мин при +4 °С. Супернатант отбрасывали, полученную гранулированную клеточную массу суспендировали в 5-кратном объёме 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора с pH=7,4 («ПанЭко», Россия, серия 1116) при +4 °С в течение 5 мин и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Супернатант отбрасывали, в полученную компактную клеточную массу (1,0 мл) добавляли 4-кратный объём (4,0 мл) гипотонического раствора NaCl (0,65%), охлаждённого до 0 °С, для проведения гипотонического лизиса и смесь выдерживали 5 мин при 0 °С. Далее содержимое центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин и супернатант отбрасывали, в полученную компактную клеточную массу добавляли 8 мл (125 мкг/мл, 250 мкг/мл, 275 мкг/мл) водного стандартного раствора препарата (VCR, VBL), охлаждённого до 0 °С по фракциям до полного гемолиза и все инкубировали при +4 °С в течение 20 мин. Затем восстанавливали цельность эритроцитов добавлением 9,0% гипертонического раствора NaCl до изотоничности. Полученную суспензию инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После включения препарата в эритроциты последние дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида (0,9%), затем осаждали при +4 °С в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, полученную иммобилизированную форму препарата в эритроцитах хранили в холодильнике при +4 °С с добавлением 1,0 мл 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора.

Все химические субстанции, которые применялись для приготовления различных реактивов и растворов, соответствовали категории «ч.д.а.» (ЗАО «Вектон», Россия).

Приготовление буферных растворов осуществляли в соответствии с ОФС «Буферные растворы» ГФ XIII [10]. Контроль pH растворов осуществлялся при помощи pH-метра pH-150M (РУП «Гомельский завод измерительных приборов»).

Для изучения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) был использован метод нефелометрии, позволяющий оценить зависимость физиологического состояния и химического состава частиц от светопроницаемости. Методика определения ОРЭ достаточно точна, объективна, легко выполнима и, главное, позволяет охарактеризовать не только минимальную и максимальную резистентность клеток, но и динамику гемолиза.

Для инкубации эритроцитов и ТИА-инкапсулированных эритроцитов использовали 0,01 М Na-фосфатный буферный раствор с pH=7,4, в котором клетки сохраняют свои функциональные свойства в течение нескольких суток. Под нефелометрией обычно понимают ряд построений, использующих данные по зависимости мутности (τ) системы от длины волны (λ) падающего света.

$$\tau=2,3A/l,$$

где A – оптическая плотность, l – длина кюветы. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см относительно 0,01 М Na-фосфатного буферного раствора с pH=7,4.

Размер эритроцитов определяли после экспериментального определения $\mu_{эр}$ – относительного показателя преломления эритроцитов по формуле [7]:

$$\bar{r} = \frac{\mu_{эр} \cdot \alpha}{4\pi \cdot \mu_0 (m-1)},$$

где $\bar{r}$ – радиус эритроцитов; m – относительный показатель преломления среды, (m=$\mu_{эр}/\mu_0$), $\mu_{эр}$ – относительный показатель преломления эритроцитов, μ_0 – относительный показатель преломления инкубирующей среды; α – функция относительного размера ($\alpha=2\pi r/\lambda$).

Относительный показатель преломления эритроцитов ($\mu_{эр}$) определяли рефрактометрическим методом на рефрактометре ИРФ-454 Б2М (Россия), для чего готовили серию инкубационной среды, в которой относительный показатель преломления (μ_0) находился в пределах 1,3–1,4 с градиентом 0,01. Для изменения относительного преломления среды (m) в инкубирующую среду добавляли разное количество полиэтиленгликоля (ПЭГ-4000). По 0,2 мл контрольных и ТИА-инкапсулированных эритроцитов разбавляли до 2,0 мл Na-фосфатным буферным раствором. В каждую пробирку добавляли по 0,1 мл разбавленной суспензии эритроцитов, тщательно перемешивая до полного диспергирования клеток. Затем измеряли спектральную зависимость оптической плотности каждой полученной суспензии в диапазоне длин волн 600–900 нм. Из зависимости оптический плотности (D) от волновой экспоненты (n) по определённому значению n из таблицы n=n(α), указанной в монографии В.И. Кленина [8], определяли значения α. Далее в зависимости $\sqrt[n]{D}$ от $\mu_{ср}$ путем экстраполяции аппроксимальной линии тренда до абсциссы определяли $\mu_{эр}$ (рисунок 1). Результаты представлены в таблице 1.

Расчет параметров ЭН проводили по известным формулам [9]:

- числовые концентрации эритроцитов в едином объёме:

$$N = \frac{12{,}6 \cdot \tau \cdot \mu_0^2}{\lambda_{ср}^2 \cdot K \cdot \alpha^2},$$

где К – коэффициент рассеяния [8];

- плотность эритроцита, г/см^3:

$$\rho = 1{+}1{,}5 \cdot (m{-}1);$$

- концентрация сухого вещества в эритроците, %:

$$C = 605{,}0 \cdot (m{-}1);$$

- содержание сухого вещества в эритроците, пг:

$$C_{\%} = 3{,}15 \cdot (m{-}1) \cdot \bar{r}^3;$$

- содержание воды в эритроците, %:

$$C_в = 100 - 0{,}75 \cdot C_{\%}.$$

Исследования ОРЭ проводили для нормальных эритроцитов и форм, загруженных ТИА. Минимальная резистентность эритроцитов определяется максимальной концентрацией гипотонического (менее 0,85%) раствора натрия хлорида (в серии постепенно уменьшающихся концентраций), при которой начинается гемолиз наименее устойчивых эритроцитов, находящихся в растворе 1 ч. Максимальная резистентность

Таблица 1.

Физико-химические параметры ТИА-инкапсулированных эритроцитов (λ=660 нм; $\mu_{ср}$ – буфер=1,335)

№ п/п	Физико-химические параметры эритроцитов	Свободные эритроциты	ТИА-инкапсулированные эритроциты		
			Эри-ТИА-ПЭГ 1:20	Эри-ТИА-VCR	Эри-ТИА-VBL
1	Уравнения аппроксимирующей кривой в зависимости log D – log λ	y = 1,2461x – 3,2557	y = 1,4256x – 3,7593	y = 1,2089x – 3,1507	y = 1,2089x – 3,1507
2	Уравнения аппроксимирующей кривой в зависимости $\sqrt[n]{D}$ – $\mu_{ср}$	y = –0,0935x + 1,4817	y = –0,097x + 1,4882	y = –0,1017x + 1,4926	y = –0,0985x + 1,4892
3	$\mu_{эр}$	1,4817	1,4882	1,4886	1,4892
4	m	1,10989	1,11476	1,11506	1,11551
5	n	1,2461	1,4256	1,2089	1,2244
6	ρ	11,8	10,6	11,0	11,0
7	$\bar{r}$, мкм	4,2267	3,7930	3,7631	3,7487
8	Средний диаметр (d), мкм	8,4535	7,5861	7,5261	7,4975
9	ρ эритроцитов, г/см^3	1,1648	1,1696	1,1726	1,1733
10	Концентрация эритроцитов в 1 см^3 пробы (N)	$6{,}07 \cdot 10^7$	$9{,}07 \cdot 10^7$	$6{,}75 \cdot 10^7$	$7{,}56 \cdot 10^7$
11	Концентрация сухого вещества в эритроците (С), %	66,48135	69,4540	69,6113	69,8775
12	Содержание сухого вещества в эритроците ($C_{\%}$), пг	209,1747	157,8731	143,0619	153,3324
13	Содержание воды в эритроците ($C_в$), %	50,1390	47,9095	47,7915	47,5919
14	ППЭМ	1,32594	1,44864	1,45656	1,46853

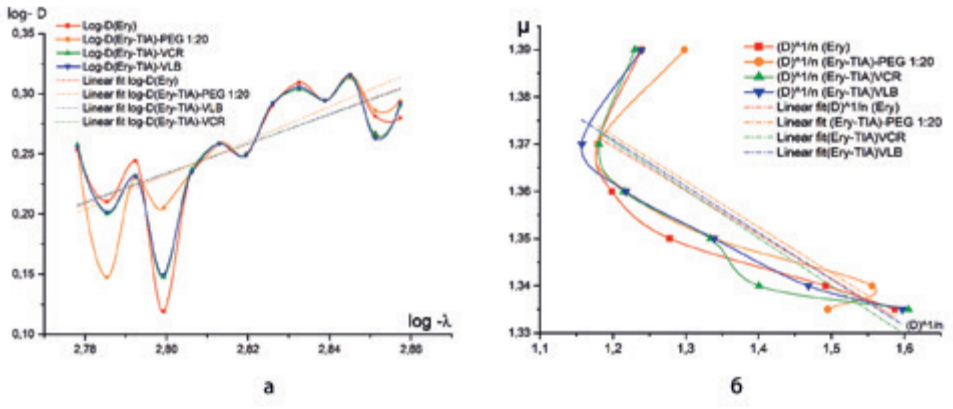


Рисунок 1. **а – определение n в зависимости log D–log λ у свободных эритроцитов и эритроцитов, инкапсулированных ТИА; б – определение $\mu_{эр}$ в зависимости $\sqrt[n]{D}$ – $\mu_{ср}$ у свободных эритроцитов и эритроцитов, инкапсулированных ТИА**

эритроцитов определяется максимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида, вызывающего в течение 1 ч гемолиз всех эритроцитов.

0,5 мл клеточной формы, загруженной ТИА-препаратами, разбавляли до 2,0 мл изотоническим Na-фосфатным буферным раствором с pH=7,4. Готовили ряд растворов, соответствующих растворам натрия хлорида с концентрациями в диапазоне 0,9–0,1%. В 10 пробирок для центрифугирования добавляли по 5,0 мл раствора и по 0,02 мл клеточной формы, затем инкубировали при 37 °С 60 мин. Далее центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин. Из каждой пробирки сливали надосадочную жидкость и фотометрировали при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см относительно контрольной пробы. Контрольная проба – надосадочная жидкость, содержащая рабочий раствор с концентрацией натрия хлорида 1%. За полный (100%) гемолиз принимали гемолиз в пробирке с 0,1% раствором натрия хлорида. Вычисляли процент гемолиза, сравнивая величину экстинкции надосадочной жидкости с экстинкцией, принятой за 100%, по формуле:

$$\text{Гемолиз, } \% = \frac{E_i}{E_x} \cdot 100\%,$$

где E_i — экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% раствором натрия хлорида; E_x — экстинкция исследуемой пробы.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 ГФ XIII [10] при использовании пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Excel 2016 на базе ОС Windows 10) и Originpro 2016 (2016 г. от компания OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были изучены физико-химические свойства для ТИА-инкапсулированных эритроцитарных носителей и контрольных эритроцитов. При проведении сравнительного анализа физико-химических параметров эритроцитов установлен относительный показатель преломления (m) у контрольных эритроцитов (1,10989±0,0001) и у ТИА-инкапсулированных эритроцитов (1,11511±0,0010) (при P>0,05). Абсолютный показатель преломления контрольных эритроцитов (μ) был равен 1,4817±0,00045, а у ТИА-инкапсулированных эритроцитов – 1,48867±0,00125 (при P>0,05). Концентрация эритроцитов (N) в контрольной пробе составила (6,07±0,009921)×10^7 в $см^3$, а у ТИА-инкапсулированных – (7,57±2,0496)×10^7 (при P>0,05).

Проницаемость мембран эритроцитов изучалась нами по изменению трех физико-химических показателей: концентрации (С, %), содержания сухого вещества ($С_{\%}$, пг) и содержания воды ($С_В$, %) в эритроците. Для оценки нарушений проницаемости мембран эритроцитов нами был предложен показатель проницаемости мембран эритроцитов (ППМЭ), который представляет собой отношение содержания воды в эритроците ($С_в$) к концентрации сухого вещества в эритроците ($С_{\%}$). В контрольных эритроцитах ППЭМ составлял 1,32594±0,00232, а у ТИА-инкапсулированных эритроцитов – в среднем 1,45791±0,02487. В таблице 2 представлены результаты, показывающие умень-

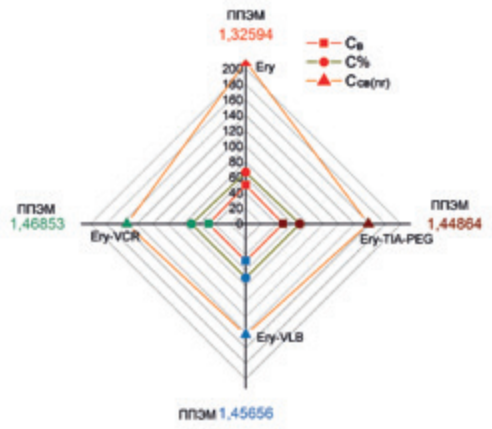


Рисунок 2. **Физико-химические параметры ТИА-инкапсулированных и контрольных эритроцитов**

шение ОРЭ в ТИА-инкапсулированных эритроцитах по отношению к контрольным. ТИА-инкапсулированные эритроциты гемолизируются в 0,40% растворе NaCl приблизительно на 60%, а контрольные в тех же условиях – на 30%. Данные рисунка 3 показывают, что эритроцитарные носители, заполненные ТИА в модифицированной среде с ПЭГ 1:20, показывают степень гемолиза несколько ниже, чем в немодифицированной среде.

Таблица 2.

Результаты определения степени гемолиза различных ТИА-загруженных эритроцитарных форм

Концентрация NaCl, %	Степени гемолиза $K_{(Hb)}$, %			
	Контрольные эритроциты	ТИА-эритроциты (Ery-TIA)	ТИА-ПЭГ-эритроциты (Ery-TIA-PEG)	ТИА-ДМСО-эритроциты (Ery-TIA-DMSO)
0,1	100	100	100	100
0,2	95,322	99,171	94,859	96,277
0,3	80,263	89,589	87,543	89,176
0,4	29,349	66,607	62,871	66,046
0,5	13,670	33,465	31,953	32,506
0,6	5,300	24,352	23,085	23,578
0,65	4,240	15,166	14,700	14,891
0,7	3,582	7,061	6,832	6,963
0,8	3,107	5,548	5,383	5,481
0,9	1,118	4,035	3,761	3,861

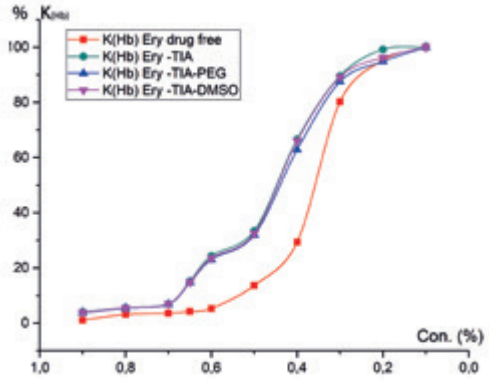


Рисунок 3. Степени гемолиза различных ТИА-загруженных эритроцитарных форм

В проведенном *in vitro* эксперименте с высвобождением гемоглобина из ТИА-инкапсулированных эритроцитарных форм установлено, что ущерб, нанесенный при инкапсуляции в эритроциты изучаемых лекарственных веществ, невелик и по функциональным способностям они незначительно отличаются от нормальных эритроцитов (рисунок 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение физико-химических свойств ТИА-инкапсулированных и контрольных эритроцитов показало изменения по некоторым параметрам, таким

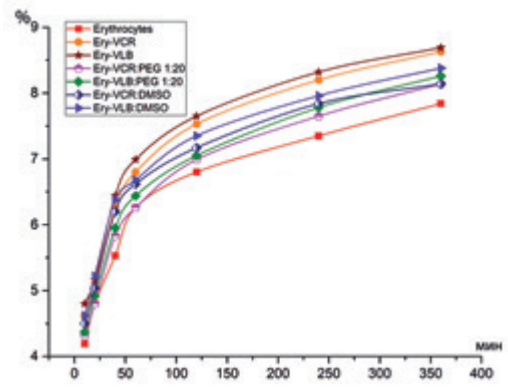


Рисунок 4. Высвобождение гемоглобина из ТИА-загруженных эритроцитов *in vitro*

как показатель проницаемости мембран эритроцитов, диаметр клеток, концентрация, содержание сухого вещества в эритроците, содержание воды в эритроците и степень гемолиза (таблицы 1 и 2), которые могут влиять на жизненный цикл ТИА-инкапсулированных ЭН в организме. В эксперименте *in vitro* установлено, что изменение физико-химических параметров почти не нарушает функциональные свойства ТИА-инкапсулированных эритроцитов. Установлено, что ТИА-инкапсулированные эритроциты восстанавливаются на 60–80%. Следовательно, показана возможность применения ТИА-загруженных ЭН в качестве систем для доставки противоопухолевых лекарственных средств – винкристина и винбластина.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Gutiérrez Millán et al. Cell-baseddrug-deliveryplatforms // Therapeutic Delivery. 2012. V. 3. № 1. P. 25-41.
2. C.H. Villa, J. Seghatchian, V. Muzykantov. Drug delivery by erythrocytes: «Primum non nocere» // Transfusion and Apheresis Science. 2016. V. 55. № 3. P. 275–280.
3. L. Rossi et al. Engineering erythrocytes for themodulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution // Advanced Drug Delivery Reviews. 2016. V. 106. P. 73–87.
4. M. Magnani. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting. – Texas: Springer, 2002. 151 p.
5. S. Ravilla et al. Erythrocytes as carrier for drugs, enzymes and peptides // Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2012. V. 2. № 4. P. 166–176.
6. P. Xu et al. Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems // Onco Targets and Therapy. 2016. V. 9. P. 2873–2884.
7. AC SU 1337349 A1. Способ определения размера клеток / Б.И. Шварцбург. – № 3748690/28-14; заявл. 01.06.84; опубл. 15.09.87; Бюл. № 34.
8. В.И. Кленин, С.Ю. Щеголев, В.И. Лаврушин. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. – Саратов: Сратовский университет, 1977. 177 с.
9. О.И. Кулапина и др. Проницаемость мембран эритроцитов у больных с инфекционной патологией // Критические технологии. Мембраны. 2005. Т. 1. № 25. С. 3–11.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. URL: http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online (дата обращения 10.12.2017).

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Ультраскоростные хроматографы





ВЭЖХ

Системы Alliance HPLC System

- Max. давление - 5 000 psi
- Диапазон задания потока элюента - от 0,000 до 10,000 мл/мин с шагом в 0,001 мл/мин
- Max. количество растворителей - 4
- Max. количество образцов - 120
- Min. объем образца - 10 мкл

УВЭЖХ

Системы ACQUITY UPLC

- Max. давление - 15 000 psi
- Диапазон задания потока элюента - от 0,010 до 2,000 мл/мин с шагом в 0,001 мл/мин
- Max. количество растворителей - 4
- Max. количество образцов - 768 образцов в двух 384-луночных планшетах с возможностью расширения до 8 448 образцов при заказе дополнительной опции
- Min. объем образца - 5 мкл

Технологии признанного мирового лидера в области оборудования для ВЭЖХ и УВЭЖХ - высокая надежность, универсальность, точность подачи растворителя, автоматический отбор проб и детектирования - позволяют создать заново систему ВЭЖХ под ваши аналитические задачи!

Techlabimport
ДИСТРИБЬЮТОР ОБОРУДОВАНИЯ

+7 (499) 674-05-40 (центральный офис в Москве)

sales@techlabimport.ru (24/7 служба приема заказов)

Мы уверенно смотрим в будущее и поможем нашим клиентам в этом!

http:// techlabimport.ru

УДК 616.932; 615.371

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНТРОЛЮ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

А.В. Гаева[1]*, О.В. Громова[1], О.С. Дуракова[1], С.В. Генералов[1], О.А. Волох[1]

Резюме. В обзоре рассмотрены требования к производству лекарственных веществ, современные направления в тестировании токсичности получаемых препаратов. Приведены результаты исследований использования клеточных линий для оценки биоактивных веществ, в том числе и холерного токсина. Оценены преимущества использования методов *in vitro*, в частности применения перевиваемых клеточных линий на этапах производства холерной химической вакцины.

Ключевые слова: вакцины, токсигенность, культура клеток.

MODERN APPROACHES TO THE CONTROL OF ACTIVE COMPONENTS OF CHOLERA CHEMICAL VACCINE

A.V. Gaeva[1]*, O.V. Gromova[1], O.S. Durakova[1], S.V. Generalov[1], O.A. Volokh[1]

Abstract. The paper considers the requirements to the production of pharmaceutical substances and the current trends in the toxicity assessment of the preparations obtained. The results of research of the use cell cultures for test bioactive substances, including cholera toxin are given. Evaluated are the advantages of in vitro methods application, in particular, continuous cell lines at some stages of cholera chemical vaccine manufacturing.

Keywords: vaccines, toxigenicity, cell culture.

1 – ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

1 – Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: rusrapi@microbe.ru
Тел.: 8 (8452) 26 21 31

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в практическом здравоохранении применяются вакцины, разработанные много лет назад, но усовершенствованные по мере развития медицинской науки. Усовершенствование вакцин обусловлено необходимостью повышения их безопасности, переносимости и эффективности.

Основные типы вакцин, лицензированных для клинического использования, содержат живые ослабленные, убитые или инактивированные микроорганизмы. Меньшее количество препаратов основано на очищенных компонентах микроорганизмов, а совсем немногочисленная группа – на белках, синтезированных с помощью метода рекомбинантных ДНК [1].

Современное производство вакцин, как и других медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), должно основываться на соблюдении санитарных правил СП 3.3.2.015-94 «Производство и контроль медицинских иммунобиологических препаратов для обеспечения их качества» – документа, соответствующего зарубежным Good Manufacture Practice (GMP). Этот нормативный документ включает комплекс требований к производству и контролю МИБП, гарантированно обеспечивающих их активность, безопасность и стабильность, и распространяется на все предприятия, производящие МИБП. Безопасность вакцин оценивается системой из пяти уровней контроля, один из которых, контроль качества вакцин на предприятии-изготовителе, предусматривает обязательный поэтапный контроль материала на безопасность на разных стадиях технологического процесса (контроль исходного сырья, полуфабриката, готовой продукции) [2].

Основным нормативным документом, определяющим требования к качеству МИБП и методы его контроля, является фармакопейная статья (ФС), утверждаемая Министерством здравоохранения РФ. Фармакопейная статья, являющаяся государственным стандартом, содержит требования, предъявляемые ВОЗ к биологическим продуктам, что позволяет осуществлять выпуск отечественных препаратов на уровне мировых стандартов.

Документом, определяющим технологию производства МИБП, является регламент производства препарата (РП), который согласовывается с контролирующей организацией.

Требования к безопасности испытуемого препарата касаются подтверждения безвредности и отсутствия токсичности, токсигенности и вирулентности. Для определения безопасности испытуемого препарата используют биологические методы *in vivo*.

Проведение теста на безвредность позволяет выявить негативные воздействия испытуемого препарата на организм животного. Контроль препарата по данному показателю является обязательным при отборе и хранении производственных штаммов, отработке новых технологий производства лекарственного средства, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности [3].

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и лицензированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава. Актуальным вопросом производства вакцин остается усовершенствование методов контроля. Вакцинный штамм должен быть проверен на остаточную вирулентность и токсигенность по комплексу тестов *in vivo* и *in vitro*. К числу тестов *in vivo* относятся определение вирулентности на модели кроликов-сосунков; определение остаточной токсигенности (выявление фактора сосудистой проницаемости и дерматонекротического фактора) в кожной пробе; определение остаточной токсигенности в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов; определение остаточной токсигенности, реактогенности и приживаемости штамма при внутрижелудочном заражении взрослых кроликов [4]. На промежуточных стадиях производства вакцины (контроль полуфабрикатов, готовой продукции) используют общепринятые методы проверки токсичности на лабораторных животных. Качество полуфабриката холерогена-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина, которая тестируется в соответствии с промышленным регламентом на производство методом кожной пробы по *Craig,* иммунохимическими методами РПИГ и GM_1-ELISA. Количество холерогена-анатоксина в таблетках вакцины определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксиносвязывания. В данных реакциях, а также для получения антихолерогенной сыворотки используется холерный токсин. На многих этапах производства холерной вакцины используют несколько видов лабораторных животных. В то же время в литературных источниках приводятся результаты исследований, свидетельствующие о возможности использования альтернативных методов, таких как применение перевиваемых клеточных культур [5–7].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO*: АКТУАЛЬНОСТЬ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МОДЕЛИ

Исторически сложилось, что токсикологическая экспертиза проводится на основании данных острых, подострых, хронических и других специальных исследований на теплокровных животных (мыши, крысы, кролики, морские свинки, реже – собаки, кошки, обезьяны) [8, 9].

Эксперименты с использованием животных являются трудоемкими и дорогостоящими, в результате подопытные животные травмируются и гибнут. Однако эти исследования крайне важны для сохранения здоровья человека.

В связи с этим сегодня вполне обоснованы разработки ученых, направленные на максимальное сокращение количества животных и замену их альтернативными моделями и тест-системами в условиях *in vitro*.

В 1959 году микробиолог R. Birch и зоолог W. Russel в Лондоне издали книгу «The principle of humane experimental technique», в которой сформулирована концепция «трех R» (Replacement, Reduction, Refinement). В книге отражены общепризнанные принципы гуманного использования животных в исследовательских и образовательных целях. Сегодня концепция «трех R» является самой передовой в области научных исследований. В данной теории Replacement означает замену на методы, позволяющие получить результаты без проведения экспериментов на животных. Reduction включает методические подходы, позволяющие получать сравнительную информацию при использовании меньшего числа животных либо большее количество данных на том же количестве животных. Refinement включает методы, исключающие или вызывающие минимальную боль, страдания и стресс у животных. Благодаря этой концепции удалось привлечь внимание к данной проблеме академических центров, что привело к существенному изменению техники исследований, испытаний и обучения с пользой как для науки, здоровья общества и образования, так и в интересах защиты экспериментальных животных [10–12].

Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество настоятельно рекомендуют и поддерживают использование альтернативных моделей и методов. Сегодня вопросы этического, разумного и экономного использования животных в исследованиях в области медицины, био-

логии и ветеринарии привлекают все большее внимание специалистов и общественности. Использование альтернативных методов *in vitro* снимает целый ряд этических проблем, возникающих при использовании большой группы животных. Кроме того, что эксперименты на животных не всегда обеспечивают результаты, которые можно экстраполировать на людей [13].

Одним из важных и необходимых этапов при отборе бактериальных антигенов в качестве возможных компонентов химических вакцин является изучение их токсических свойств. Токсичность – комплекс явлений, среди которых могут быть прямое повреждение клеток (как в случае цитотоксического действия противораковых препаратов), физиологические эффекты (мембранный транспорт в почках, нейротоксичность в мозге), воспалительное действие (как местное, так и общее). Большинство исследований определяют токсическое действие на клеточном уровне – цитотоксичность. Определения цитотоксичности разнообразны: в зависимости от природы исследования, а также от того, убивает препарат клетки или просто изменяет их метаболизм [14].

Современные научные технологии создают широкие возможности для использования в токсикологических исследованиях альтернативных методов на клеточном и молекулярном уровнях, которые заменяют классические методы определения опасности и оценки риска химических веществ. Показано, что они являются достаточно точными, простыми, перспективными, универсальными, экономически рентабельными [10, 15].

В качестве моделей *in vitro* используются системы различной биологической организации: беспозвоночные животные, гидробионты, микроорганизмы, растения, культуры клеток человека и животных, бесклеточные физико-химические тест-системы [11].

В настоящее время проводятся исследования по сравнению ряда генотипических, фенотипических и биологических методов определения активности различных токсинов (дифтерийный, холерный, микотоксины). Генетические методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют выявить наличие в бактериях гена токсигенности, однако основной недостаток данных методов состоит в том, что они не дают информацию о способности микроорганизма к экспрессии биологически активного токсина. Поэтому ПЦР рекомендуется применять как дополнительный к фенотипическим тестам метод [16, 17].

Иммунохимические методы обнаружения и количественного анализа различных токсинов, в частности ИФА-системы, остаются наиболее используемыми, достоверными. На их основе разработаны коммерческие тест-системы, некоторые из них имеют высокую чувствительность [18, 19]. Проведен ряд исследований по разработке наиболее удобных методов тестирования *in vitro* токсинов различных бактерий (*Corynebacterium diphtheriae, Burkholderia pseudomallei, Vibrio cholerae*). К таким тестам относятся варианты иммуноферментного анализа, тест с иммунохроматографическими полосками (ICS), тест иммунопреципитации Элека, тест с использованием метилтетразолиевого красителя (МТТ), показана корреляция результатов, полученных при использовании методов *in vivo* и *in vitro* [20, 21]. Для определения активности холерного токсина (ХТ) широко апробированным является метод иммуноферментного анализа. При этом наибольшей чувствительностью отличаются методы, связанные с использованием ганглиозидов GM_1, обладающих сродством к иммуногенной В-субъединице ХТ [22–25]. В качестве экспрессного метода при определении активности ХТ используется также метод радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на чашках. Данный метод отличается высокой чувствительностью, простотой и быстротой постановки [26]. Классический метод нейтрализации, проводимый на животных, весьма трудоемок, сложен в постановке, дорог по материальным затратам и занимает несколько дней [27].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В ИЗУЧЕНИИ БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Для оценки потенциально токсичных биологических и химических веществ в настоящее время широко используют метод клеточной биоиндикации взамен общепринятой модели *in vivo*. Определение потенциальной токсичности антигенов возбудителей опасных инфекционных заболеваний *in vitro* на модели перевиваемых клеточных линий – чувствительный, простой в исполнении и информативный тест, который можно использовать на этапах лабораторного анализа различных внеклеточных или ассоциированных с клеточными структурами биополимеров. Установлено, что по чувствительности эти тесты сопоставимы с разрешающей способностью биопробы [14, 28, 29].

Культуры клеток представляют собой гомогенную популяцию генетически однородных клеток, растущих в постоянных условиях. Условия можно менять в определенных пределах, что позволяет оценивать влияние на рост клеток различных факторов: pH, температуры, концентрации аминокислот, витаминов и т.д. [14].

Так как клетки в культуре легко доступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними вещества (яды, токсины, гормоны) могут быть введены в разной концентрации и в течение заданного количества времени.

Главным направлением использования клеточных культур представляется тестирование и изучение

механизма действия различных веществ, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов. Результаты, полученные на клеточных культурах, нельзя, безусловно, экстраполировать на целые организмы, тем не менее, если препарат оказывает повреждающее действие в нескольких линиях культивируемых клеток, то следует ожидать неблагоприятного эффекта и при введении этого вещества целому животному. Помимо того, что использование культур клеток избавляет от страданий большое количество животных, использование культур клеток человека позволяет оценивать повреждающее действие веществ у вида, недоступного для экспериментов такого рода, то есть у человека. Более того, результаты тестов оказываются более воспроизводимыми, когда они проводятся *in vitro* [30].

Для обеспечения системного подхода к оценке биологического действия изделий медицинского назначения, разрабатываемых для применения *in vivo*, в нашей стране введен в действие ГОСТ ISO 10993-5-2011 [31]. Стандарты этой серии являются руководящими документами для прогнозирования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых образцов.

Одним из преимуществ применения клеточных культур является возможность прижизненного наблюдения и оценка результатов взаимодействия компонентов сложных антигенных комплексов бактерий с клетками-мишенями по изменению морфофункциональных параметров клеток под действием потенциально токсических веществ [16, 32–34]. В мире накоплен большой объем информации о преимуществах этих методов как наиболее технологичных, объективных, точных и удовлетворяющих требованиям биоэтики.

Результаты исследований дифтерийного токсина, проведенных параллельно с помощью кожной пробы на кроликах и в культуре клеток Vero, оказались сопоставимы, вместе с тем реакция нейтрализации на культуре клеток проще, дешевле, доступнее, стандартнее и нагляднее, чем реакция нейтрализации на животных [35]. Однако результат и в этом же тесте можно получить лишь спустя несколько дней, что ограничивает его применение при проведении исследований в клинической лаборатории, где результат должен быть получен в минимально короткие сроки. В связи с этим в практической лабораторной практике преимущество получили тесты определения токсинопродукции в реакциях агглютинации, преципитации, а также при использовании иммуноферментных и генетических тест-систем. В работе Е.В. Пименовой (2015) [28] получены достоверные доказательства эффективности использования перевиваемых клеточных линий CHO-K1 и L-929 для качественной и количественной оценки биологической активности растворимых антигенов *Burkholderia pseudomallei* в тесте микроцитотоксичности взамен общепринятого метода с использованием лабораторных животных.

Исследованы культуры клеток различных линий для оценки биологической активности токсинов холерного вибриона (CHO-K1, CaCo2, L-929, HeLa, McCoy, Vero, MDCK, Hep-2) [33, 36, 37]. Наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура CHO-K1, позволяющая выявлять до 20–30 пг/мл токсина, в то же время моделью, наиболее приближенной к условиям *in vivo,* является культура эпителиальных клеток тонкого кишечника человека CaCo2, образующая монослои, подобные нормальному эпителию кишечника [5, 6, 38]. О.И. Сальникова с соавт. (2002) [33] показали, что оптимальными приемами тестирования токсина *in vitro* в бесклеточных супернатантах бульонных культур холерных вибрионов является сочетание двух высокочувствительных и специфичных методов: ИФА в варианте «двойных» антител на основе моноклональных антител к холерному токсину и кроличьей антитоксической сыворотки и титрование токсина в микрокультуре клеток CHO-K1.

Современные технологии позволяют разрабатывать новые альтернативные модели для токсикологических исследований. Так, система для клеточного анализа в режиме реального времени RTCA iCELLigence основана на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически и в реальном времени анализировать клеточный ответ без использования дополнительных маркеров или меток. Прибор применяется для широкого диапазона клеточных исследований, в том числе для определения адгезии и прилегания клеток, пролиферации и дифференциации клеток, цитотоксичности различных компонентов и их влияния на апоптоз, рецепторной передачи сигнала, контроля качества клеток, цитопатогенных свойств вирусов. Система позволяет получать количественные результаты высокого качества, с высокой степенью точности, воспроизводимости. В работе D. Jin с соавт. (2013) [37] использовали четыре клеточные линии для определения цитотоксичности холерного токсина. При изучении 200 изолятов холерного вибриона выявлено изменение клеточной морфологии исключительно для образцов токсигенных штаммов. Применение метода XT-RTCA выявило чувствительность и специфичность 97,5% и 100% соответственно для штаммов холерного вибриона. Ранее эта система была использована для определения токсинов *Clostridium difficile* в качестве альтернативного определения цитотоксичности [37].

Способ оценки токсичности на одноклеточных организмах – инфузориях также используется в медицинских исследованиях, отличается достаточной

простотой и может применяться в любой санитарно-бактериологической лаборатории. Инфузории, будучи клеткой и организмом одновременно, позволяют оценить разнообразные воздействия как на клеточном, так и на более высоком организменном уровне. Описан метод определения токсичности на культуре инфузорий *Tetrachymena pyriformis* по степени задержки роста культуры под воздействием исследуемых антигенов чумы и холеры [39]. Получен патент на изобретение по определению токсической концентрации бактериального антигена по степени угнетения выделительной функции инфузорий [40].

Еще одно из направлений использования современных технологий в изучении токсических влияний возможных компонентов вакцин – разработка вариантов микробиореакторов. Микробиореакторы представляют собой микрофлюидные системы, содержащие модули для совместного культивирования нескольких органоспецифических клеточных линий (ОСКЛ) и моделирующие взаимодействия между ними в условиях близкого к физиологическому тока жидкости. Их применение является альтернативой традиционным методам скрининга с использованием клеточных культур и последующими доклиническими испытаниями на животных. С помощью клеточных культур может быть получена информация о терапевтических эффектах определенного соединения на целевую ткань, но не на весь организм в целом, а данные, полученные на животных моделях, не всегда могут быть экстраполированы на человека. Микробиореакторы, моделирующие физиологические взаимодействия между органами, позволяют проводить более эффективный скрининг лекарственных веществ и их комбинаций [41, 42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с принципом «три R» эксперименты на животных, как ожидалось, должны иметь тенденцию к сокращению по разным соображениям, в том числе этическим. Однако на практике эта тенденция не находит кардинального воплощения. По-прежнему, несмотря на значительный прогресс в использовании принципиально новых и тонких методов экспериментальных медико-биологических исследований, стандартные эксперименты *in vivo* остаются незаменимыми и наиболее релевантными для экстраполяции экспериментальных эффектов лекарственных средств на человека [43].

Традиционные тест-системы, такие как клеточные культуры *in vitro,* дают первичное представление об эффективности и токсичности вещества. Эти данные пока еще нуждаются в дальнейшей проверке на моделях животных, и на конечном этапе производства данные о безвредности и эффективности компонентов требуют проверки на моделях животных (*in vivo*).

Вместе с тем очевидны преимущество, целесообразность и даже вынужденная необходимость использования альтернативных методов исследования *in vitro*. В связи с вышеизложенным замена методов определения специфической активности ХТ на биомоделях при производстве холерной химической вакцины на высокочувствительные, воспроизводимые, простые в постановке методы *in vitro* является актуальной задачей и определяет необходимость их внедрения в производственный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. J.B. Ulmer, U. Valley, R. Rappuoli. Vaccine manufacturing: challenges and solutions // Nature Biotechnology. 2006. URL: http://www.cbio.ru/ doi:10.1038/nbt1261 (дата обращения 15.02.2018).
2. Н.В. Медуницын. Государственная система оценки безопасности вакцин // Инф. Бюл. Вакцинация. 2000. № 2(8). С. 3–4.
3. ОФС.1.7.2.0001.15. Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo* // Государственная фармакопея РФ. XIII изд.
4. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.
5. О.И. Сальникова, Л.П. Алексеева, Л.С. Подосинникова, В.В. Лобанов, А.В. Карагозова, О.В. Смирнова, А.Б. Мазрухо. Чувствительность культуры клеток СНО и ТИФА при тестировании холерного токсина *in vitro* // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. 1999. Вып. 12. С. 83–84.
6. О.И. Сальникова, О.В. Маркина, А.Б. Мазрухо, Л.М. Овсова, Л.П. Алексеева, Б.Л. Мазрухо, И.С. Шестиалтынова, Д.И. Каминский. Оценка токсинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона, выделенных при вспышке холеры в Казани в 2001 году, на модели культуры клеток СНО-К1 и ИФА-2АТ // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. 2002. Вып. 15. С. 41–42.
7. О.В. Маркина, Л.П. Алексеева, Е.В. Монахова. Культуры клеток в изучении биологической активности токсинов *Vibrio cholerae*, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Esherichia coli* // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. 2006. Вып. 19. С. 91–93.
8. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М: Медицина, 2002. 608 с.
9. И.М. Трахтенберг, Л.А. Тимофеевская, И.Я. Квятковская. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Отв. ред. М. Трахтенберг. – Рига: Знание. 1987. 172 с.
10. Н.Н. Дмитруха. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях // Medix Anti-Aging. 2013. № 3(33). С. 50–55.
11. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М. 2010. 344 с.
12. C.A. Schuppli, D. Fraser. The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members // ATLA. 2005. V. 33. № 5. P. 487–500.

13. Л.Л. Беляева, М.А. Крючкова, С.А. Танасева, Э.И. Семенов. Альтернативные методы исследования цитотоксичности микотоксинов // Актуальные вопросы в научной работе и образовательной деятельности: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции 30 апреля 2014 г. Ч. 10. – Тамбов. 2014. 163 с.

14. Р.Я. Фрешни. Культура животных клеток: практическое руководство. – М: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 714 с.

15. S. Cinelli, A. Falezza, C. Meli. Alternative methods in toxicology tests: *in vitro* toxicity // Cytotechnology. 1991. V. 5. № 1. P. 51–54.

16. М.Н. Дмитриева, И.М. Грубер, Н.А. Гаврилова, Н.Г. Титова, И.В. Яковлева, В.В. Свиридов. Оценка количества дифтерийного токсина и его активности разными тестами в динамике культивирования *Corynebacterium diphtheria* PW8 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1999. № 2. С. 32–35.

17. Л.А. Краева, Т.М. Зимина, Г.Я. Ценева, А.В. Соловьев. Микротехнологии в экспресс-диагностике токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 2. С. 62–66.

18. Е.Э. Петрова, Р.Л. Комалева, О.Е. Лахтина, Л.В. Самохвалова, Н.А. Калинина, Н.С. Шошина, А.Ю. Рубина, М.А. Филиппова, Ю.В. Вертиев, Т.И. Валякина, Е.В. Гришин. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 357–368.

19. U.S. Food, Drug Administration. Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. Bacteriological Analytical Manual. 2001.

20. К.Х. Энглер, Д. Норн, Р.С. Козлов, И. Сельга, Т.Г. Глушкевич, М. Там, Р.С. Джорж, А. Эфстратиоу. Быстрые фенотипические методы определения дифтерийного токсина у клинических штаммов коринебактерий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 2. Т. 3. С. 156–163.

21. Г.Я. Ценева, Л.А. Краева, С.А. Габриелян, Е.Е. Щедеркина. Методы определения токсигенности у штаммов *Corynebacteriae diphtheriae* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2005. № 7 (45). С. 182–186.

22. Т.В. Бугоркова, С.А. Щербакова, Н.И. Белякова, Г.В. Доброва. Иммуноферментный анализ для выявления протеаз холерных вибрионов при производстве химических вакцин // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ. 30 ноября – 1 декабря 1998. – Киров. 1998. С. 291–292.

23. О.В. Маркина, Л.П. Алексеева. Иммуноферментные методы тестирования холерного токсина // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник материалов проблемной комиссии Научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. 2005. Вып. 18. С. 133–135.

24. Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, Т.Л. Захарова. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *Vibrio cholerae* // Биотехнология. 2014. № 3. С. 49–54.

25. О.С. Дуракова, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, О.В. Громова, О.А. Волох. Определение активности холерного токсина при выращивании производственного штамма *Vibrio cholerae* 569B методами *in vitro* // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. Материалы II Всероссийской научно-практической конференции (5–6 апреля 2017 г.). – Ставрополь. 2017. С. 299–300.

26. M.G. Bramucci, R.K. Holmes. Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat labile enterotoxin produced by individual colonies of *Esherichia coli* or *Vibrio cholerae* // Journal of Clinical Microbiology. 1978. V. 2. № 2. P. 252–255.

27. L. Okabe. On a method of the standardization of anti-diphtheria serum by the use of tissue cultivation // Kitasato Archive of experimental Medicine. 1933. V. 10. P. 41–56.

28. Е.В. Пименова, Н.П. Храпова. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 7. С. 247–250.

29. E. Walum, B. Ekwall. Cell toxicology a new paradigm // ALTA. 2000. V. 28. Suppl. 1. P. 159.

30. Биоэтика: учебник для вузов / Под ред. В.П. Лопатина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.

31. ГОСТ Р ИСО 10993.5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Госстандарт, 2011. 12 с.

32. М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов. – СПб. 2003. 240 с.

33. О.И. Сальникова. Культура клеток в изучении и тестировании токсинов холерного вибриона: автореф. дис. ... к.б.н. – Саратов. 1994. 20 с.

34. Animal cell culture. Third edition. A practical approach / Ed. by J.W. Masters. – Oxford. 2000. 315 p.

35. C. Placido-Sousa, D.G. Evans. The action of diphtheria toxin on tissue cultures and its neutralization by antitoxin // The British Journal of Experimental Pathology. 1957. V. 38. P. 644–650.

36. О.В. Маркина, Е.В. Монахова, Л.П. Алексеева, Р.В. Писанов. Изучение биологического действия гемагглютинин / протеазы холерных вибрионов на модели культур клеток // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Вып. 94. С. 58–61.

37. D. Jin, U. Luo, M. Zheng, H. Li, J. Zhang, M. Stampfl, X. Xu, G. Ding, Y. Zhang, Y.-W. Tang. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring // Journal of Clinical Microbiology. 2013. V. 51. № 12. P. 3968–3974.

38. M. Pinto, S. Robine-Leon, M.D. Appay. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 cells in culture // Biol. Cell. 1983. V. 47. P. 323–330.

39. Т.А. Храмченкова, О.В. Громова, М.Н. Киреев, А.В. Наумов. Индикация цитотоксического действия некоторых факторов патогенности возбудителей чумы и холеры с помощью *Tetrahymena pyriformis* // Пробл. особо опасных инфекций. – Саратов. 2000. С. 109–113.

40. Патент РФ № 2281507. Способ оценки токсичности бактериальных антигенов / С.И. Жукова, Ф.К. Адельшин и др.; патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. – № 2004133598/15; заявл. 17.11.2004, опубл. 10.08.2006.

41. Н.В. Сенявина, Е.В. Трушкин, А.Л. Русанов, В.А. Петров, А.Ю. Шкурников, У. Маркс, Д.А. Сахаров. Современные технологии тестирования лекарств *in vitro*: использование микробиореакторов // Биотехнология. 2013. № 1. С. 51–58.

42. J.H. Tsui, W. Lee, S.H. Pun, J. Kim, D.-H. Kim. Microfluidics-assisted *in vitro* drug screening and carrier production // Adv Drug Deliv Rev. 2013. November.

43. Т.А. Гуськова, Р.Д. Сюбаев, И.Н. Немкова, Г.Н. Енгалычева. Изучение токсичности лекарственных средств *in vitro* при оценке их токсикологического взаимодействия // Биомедицина. 2010. № 5. С. 74–76.

УДК 574/577; 502/504; 502: 051, 313, 330.15

НЕКОТОРЫЕ ДАННЫЕ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОНТРОЛЯ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Б.А. Комаров[1]*, Л.В. Погорельская[2], А.И. Албулов[3]

Резюме. Исследовано содержание природных радионуклидов в ромашке лекарственной и элемента германий в некоторых лекарственных растениях и женьшене различного происхождения методами масс-спектрометрии и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Обнаружено существенное различие с имеющимися в литературе данными. Обосновывается необходимость создания отечественной базы данных полного микроэлементного состава лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: радионуклиды, элемент германий, база данных.

SOME DATA FOR SUBSTANTIATION OF CONTROLLING MICROELEMENT COMPOSITION OF HERBAL PLANT RAW MATERIALS

B.A. Komarov[1]*, L.V. Pogorel´skaya[2], A.I. Albulov[3]

Abstract. The contents of natural radionuclides in camomile and of germanium element in some herbs and ginseng of different origin were determined by mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. A substantial divergence with the available literature data is found. The necessity to form a domestic database for the complete microelement composition of herbal plant raw materials is substantiated.

Keywords: radionuclides, germanium, database.

1 – ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, 142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка, ул. Акад. Семёнова, д. 1

2 – ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации», 123242, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2

3 – ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», 141142, Россия, Московская обл., Щелковский р-н, п. Биокомбината, д. 17

1 – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 1, Akademika Semenova str., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

2 – Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 2, Barrikadnaya str., Moscow, 123242, Russia

3 – All-Russia Research and Technological Institute of Biological Industry, 17, p. Biokombinata, Shchelkovo district, Moscow region, 141142, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: komarov@chgnet.ru
Тел.: 8 (496) 522 16 25

ВВЕДЕНИЕ

Известна существенная роль микроэлементов в развитии и функционировании биологических систем. Для обоснованного применения методов фитотерапии важна информация о микроэлементном составе лекарственного растительного сырья. Имеющиеся сведения в этой области получены во второй половине прошлого века с применением в основном химических аналитических методов.

Исследования микроэлементного состава лекарственных растений с помощью современных методов атомно-эмиссионной и масс-спектрометрии [1–4] выявили существенные различия с имеющимися сведениями [5, 6]. Кроме этого, установлена зависимость состава и степени концентрирования элементов в растении от его территориального происхождения [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали методы атомно-эмиссионной спектроскопии и масс-спектроскопии, позволяющие определять содержание всех элементов таблицы Д.И. Менделеева, за исключением германия, галоидов и элементов 8-й группы. Образцы ромашки лекарственной из Калужской области (1) и из Египта (Alaghsan Co) (2) были испытаны в аналитическом сертификационном испытательном центре (федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук в Черноголовке. Протокол КХА № 276 от 01 октября 2012 г., заказчик К.А. Трескунов).

Содержание элемента германий (мкг/г) в некоторых лекарственных растениях и в женьшене различного происхождения с учетом

влажности растительного сырья 10–14% вес. определяли в ООО «МИКРОНУТРИЕНТЫ». Протокол № 39961 от 01.07.2015 по методу масс-спектрометрии и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с помощью квадрупольного масс-спектрометра Nexion 300D и атомно-эмиссионного спектрометра Optima 2000 DV (Perkin Elmer, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание природных радионуклидов [7] в растительном сырье практически не учитывается на количественном уровне. В качестве примера в таблице 1 представлены данные о содержании природных радионуклидов в ромашке лекарственной из Египта и отечественной. Наибольший интерес могут представлять элементы, имеющие радиоактивные изотопы с периодом полураспада (Т) 10^9–10^{11} лет. Например, рассмотрим элемент калий, содержание которого в ромашке колеблется в пределах от 16590 до 28270 мкг/г. Соответственно радиоактивного изотопа ^{40}K содержится от 1,88 до 3,3 мкг/г.

Суточная потребность человека в этом элементе в среднем составляет 2 г (у спортсменов ≥3 г). В 2 г калия содержится 236 мкг радиоактивного изотопа ^{40}K. Предположим, что 1,66 % масс. от этого количества (~3,9 мкг) будет находиться в мышце сердца. Этого количества будет достаточно, чтобы за 1 мин самопроизвольно распадалось 60 атомов ^{40}K при константе распада (λ), равной (ln2)/T=1,014×10^{-14} мин$^{-1}$. Известно, что недостаток калия в организме человека провоцирует нарушение сердечного ритма, ухудшает здоровье и повышает риск сердечных приступов.

Эти факты, по-видимому, могут быть обусловлены особой ролью радиоактивного изотопа калия ^{40}K. Очевидно, что радиоактивные изотопы и других элементов могут выполнять существенную роль в биопроцессах органов и систем человека, и поэтому важен контроль их общего содержания не только в лекарственных растениях, но и в продуктах питания и питьевой воде.

Для человека важна информация об эссенциальных и условно эссенциальных элементах [6], к которым относится, например, элемент германий, количественная корректная информация о содержании которого в растениях, в продуктах питания и в питьевой воде практически отсутствует [1–4]. В таблице 2 представлены данные о содержании германия в некоторых лекарственных растениях и женьшене различного происхождения. Данные этой таблицы показывают, что женьшень не только отечественный [2], а, по существу, любого происхождения, так же как и чеснок и алоэ [6], не является концентратором органического германия.

Гликозиды женьшеня аналогично гликозидам других адаптогенов (элеутерококка [8], левзеи сафлоровидной [9–11]) стимулируют синтез белка и нуклеиновых кислот, снимают усталость и повышают работоспособность, обладают адаптогенными и иммуностимулирующими свойствами.

Таблица 1.

Содержание природных радионуклидов в ромашке лекарственной: 1 – из Калужской обл.; 2 – из Египта (Alaghsan Co.)

Изотоп элемента*	Содержание изотопа, %	Т, лет	Содержание природного радионуклида, мкг/г	
			1	2
^{40}K	0,0118	1,3×10^9	28270	16590
^{50}V	0,24	6×10^{15}	0,11	2,6
^{87}Rb	27,85	5,7×10^{10}	59	10,3
^{138}La	0,089	1,1×10^{11}	0,11	0,57
^{142}Ce	11,07	5×10^{15}	0,18	1,2
^{144}Nd	23,85	2,4×10^{15}	0,111	0,60
^{147}Sm	14,97	1,1×10^{11}	0,021	0,12
^{152}Gd	0,20	1,1×10^{14}	0,023	0,11
^{176}Lu	2,59	3×10^{10}	< ПО	0,0057
^{209}Bi	100	2×10^{18}	0,0013	0,0020
Th	100	1,4×10^{10}	0,0092	0,16
U	100	4,5×10^9	0,0018	0,043

Примечание: *В таблице отсутствуют теллур, рений и платина (содержат радиоактивные изотопы: ^{123}Te – 0,87 %; ^{187}Re – 62,93%; ^{190}Pt – 0,0127%), содержание которых меньше их предела обнаружения (ПО).

Таблица 2.

Содержание элемента германий (мкг/г) в некоторых лекарственных растениях и в женьшене различного происхождения

№/п	Растение	Происхождение	Содержание германия
1	Корни одуванчика	Красногорский р-н, 2015	0,02±0,003
2	Корни одуванчика	Краснодарский край, 2014	0,01±0,005
3	Корни одуванчика	Калужская обл., 2014	0,03±0,005
4	Корни дягеля	Калужская обл., 2014	0,06±0,009
5	Корни солодки	Донецкая обл., Украина, 2013	0,01±0,0019
6	Корни шиповника	Таджикистан, 2014	<0,0042
7	Трава тысячелистника	Калужская обл., 2014	0,006±0,0012
8	Корни женьшеня	Алтай, ООО «Беловодье», 2013	<0,0042
9	Женьшень, порошок, 99%	«Бинг Хан», Китай, 2015	<0,0042
10	Корень женьшеня	«Мир женьшеня», Брянск, 2014	<0,0042
11	Корень женьшеня	«Восточный мир», Китай, 2015	<0,0042
12	Корень женьшеня	Алтайский край, 2015	<0,0042

Ошибочные сведения о концентраторах [6], включая женьшень, органического германия обусловлены, полагаем, несовершенностью методов химического анализа. Современные методы основаны на атомно-эмиссионной и масс-спектрометрии и практически лишены недостатков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для правильного сбалансированного питания и обоснованного применения методов фитотерапии для профилактики и оздоровления важно создать отечественную базу данных о микроэлементном составе сельскохозяйственной продукции и лекарственных растений с указанием территориального происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б.А. Комаров, К.А. Трескунов. Роль элементов в действующих началах лекарственного растительного сырья // Материалы международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК». 5–7 декабря 2012 г. Щелково Московской обл. С. 492.
2. Б.А. Комаров, Л.В. Погорельская, М.А. Фролова, А.И. Албулов, К.А. Трескунов, О.К. Широкова, Ю.А. Комаров. Почему необходим повсеместный контроль микроэлементного состава растительного сырья? // Потенциал современной науки. 2014. № 5. С. 27–35.
3. Б.А. Комаров. Что известно о тысячелистнике? // Материалы 8-й юбилейной международной научно-практической конференции «Фитотерапия. Инновационные технологии XXI века». 18–19 января 2014 г. Черноголовка. С. 75; Б.А. Комаров. Фитохитодезы, перспективы, проблемы // Материалы 8-й юбилейной международной научно-практической конференции «Фитотерапия. Инновационные технологии 21 века». 18–19 января 2014 г. Черноголовка. С. 265.
4. Б.А. Комаров, К.А. Трескунов, Л.В. Погорельская, Н.И. Соколова, М.А. Фролова, А.И. Албулов. Микроэлементы в фитохитодезах // Материалы международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». 23–28 июня 2014. Пермь. С. 174.
5. Т.А. Гончарова. Энциклопедия лекарственных растений: лечение травами. В 2-х томах. – М.: Изд. Дом МСП, 1997. Т. 1. 560 с., Т. 2. 528 с.
6. А.В. Кудрин, А.В. Скальный, А.А. Жаворонков, М.Г. Скальная, О.А. Громова. Германий и иммунный ответ. Иммунофармакология микроэлементов. – М.: КМК, 2000. С. 386.
7. Б.В. Некрасов. Основы общей химии. Т. 3. – М: Химия, 1970. С. 334.
8. И.Н. Тодоров, С.Т. Сизова, Н.Ю. Косаганова, Ю.И. Митрохин, А.В. Герман, М.А. Митрофанова. Фармакокинетика и механизм действия гликозидов элеутерококка. Влияние экстракта на метаболизм и биосинтез белка в некоторых органах и тканях крысы // Химико-фармацевтический журнал. 1984. № 5. С. 529.
9. И.Н. Тодоров, Ю.И. Митрохин, О.И. Ефремова, Л.И. Сидоренко. Влияние экдистерона на биосинтез белков и нуклеиновых кислот в органах мышей // Химико-фармацевтический журнал. 2000. № 9. С. 3.
10. И.Н. Тодоров, Ю.И. Митрохин, О.И. Ефремова, Л.И. Сидоренко. Действие экстрактов левзеи сафлоровидной на биосинтез РНК и белков в органах мыши // Химико-фармацевтический журнал. 2000. № 9. С. 24.
11. Н.П. Коновалова, Ю.И. Митрохин, Л.М. Волкова, Л.И. Сидоренко, И.Н. Тодоров. Экдистерон модулирует противоопухолевую активность цитостатиков и их действие на биосинтез макромолекул в органах животных-опухоленосителей // Известия АН СССР. Сер.: Биологическая. 2002. № 6. С. 650.



Уверены, что мы вылечим ваш бренд вместе!

IX Практическая конференция

«PHARMABRAND-2018»



**МНОГОПРОФИЛЬНАЯ КЛИНИКА «БУДЬ ЗДОРОВ, БРЕНД»
ОТКРЫВАЕТ СВОИ ДВЕРИ!**
В программе: маркетинговая диагностика и оздоровление брендов

9 апреля, г. Москва, отель Хилтон Ленинградская
www.pharmabrand.ru

Профильные отделения по маркетинговой диагностике, скорой помощи, лечению и оздоровлению брендов. Анализируем симптомы, сдаем анализы, ставим диагноз и назначаем лечение. Что болит у вашего бренда?

В клинике infor-media Russia:

- **МЕДИЦИНСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ БРЕНДА.** Текущее состояние маркетинга, разбор стратегии и инструментария для анализа
- **КОМПЬЮТЕРНАЯ ТОМОГРАФИЯ 4D с контрастом и без.** Трансформация классики маркетинга в маркетинг новой эпохи
- **ОТДЕЛЕНИЕ РЕАНИМАЦИИ.** Будет ли Digital вытеснять «живые» коммуникации?
- **ОТДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ.** Рекламные тренды и инъекции креатива в фарме
- **РАЗБОР КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ.** Что такое сильный бренд в аптечном ритейле?
- **ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА И КРИТЕРИИ УСПЕХА:** Как фармкомпании в России подходят к планированию будущего портфеля препаратов?

Примите участие, если вас тревожит один из симптомов:

- **Practical cases:** не абстрактные стратегии, а только необходимая в работе практика!
- **Trends:** фармрынок наизнанку — невидимые цифры, индикаторы, тренды и прогнозы
- **Actual:** переход контакта из off — line в on-line
- **The future of Digital:** как цифра будет влиять на маркетинг и почему фарме нужно быть в сети?
- **Код уникальности:** стратегия позиционирования оригинальных препаратов и дженериков и отстройка от конкурентов
- **Только ТОП-спикеры, признанные эксперты фармацевтического рынка!**
- **5+ интерактивных дискуссий –** масса возможностей и всего за один день!

Специальные условия NETWORKING OPPORTUNITY для тех, кто заботится о состоянии здоровья бренда! Забронируйте встречу с партнерами в одном из кабинетов нашей клиники.

Для тех, кто занимается профилактикой, а не лечением мы приготовили **специальные скидки.**
Обратите внимание на различные возможности по участию исходя из того, какой диагноз поставили вашему бренду!

Подробная информация о конференции на сайте: www.pharmabrand.ru

УДК 661.122

УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАРАЦЕТАМОЛА, СФОРМИРОВАННОЙ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КРИСТАЛЛОВ РОМБИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

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

Резюме. Исследована лекарственная форма парацетамола, сформированная на основе молекулярных кристаллов ромбической модификации. Исследования включали в себя технологические эксперименты, оптическую микроскопию, дифференциальную сканирующую калориметрию, рентгенографию и инфракрасную спектроскопию. Установлено, что лекарственные формы парацетамола, синтезированные калориметрическим методом, наряду с повышенной растворимостью обладают существенной чувствительностью к температуре и механическому дроблению.

Ключевые слова: лекарственные формы, парацетамол, полиморфные превращения, тепловые исследования.

STABILITY OF DRUG FORM OF PARACETAMOL, FORMED ON THE BASIS OF CRYSTALS OF ROMBIC MODIFICATION

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

Abstract. Drug form of paracetamol formed on the basis of molecular crystals of rhombic modification was studied. The studies included technological experiments, optical microscopy, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and IR spectroscopy. It is found that drug forms of paracetamol, synthesized by calorimetric method, together with enlarged solubility possess remarkable sensibility to temperature and mechanic grinding. It is presented X-ray patterns, IR spectra and curves of differential scanning calorimetry.

Keywords: drug formas, paracetamol, polymorphic transformation, thermal research.

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

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский технологический институт (технический университет)», 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский пр-т, д. 26

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

2 – Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 26, Moscovskiy av., Saint-Petersburg, 190013, Russia

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

** адресат для переписки:
E-mail: vladimir@mail.ru
Тел.: 8 (812) 494 93 71

ВВЕДЕНИЕ

Парацетамол [N-(4-гидроксифенил) ацетамид] – молекулярный кристалл, введенный в практическую фармакологию в середине прошлого века, является одним из самых популярных анальгетиков. Сегодня по прошествии более чем ста лет продолжаются активные исследования его свойств и способов их модификации [1–4], методов обнаружения [5–7] и деградации [8–12].

Парацетамол может кристаллизоваться в трех различных полиморфных формах, известных как формы I, II и III [13]. Форма I, молекулярный кристалл моноклинной модификации, является стабильной при естественных условиях. Однако она характеризуется низкой технологичностью, ей присуща сыпучесть, плохое смачивание и плохое растворение. Форма II, молекулярный кристалл ромбической модификации, легко подвергается пластической деформации, подходит для прямого прессования, хорошо растворяется. Форма III крайне неустойчива и поэтому не имеет практического значения.

В [4] сообщалось о возможности получения лекарственной формы на основе кристаллов парацетамола ромбической модификации из порошка моноклинной модификации путем вакуумного испарения и конденсации с последующим калориметрическим сканированием. Лекарственные формы, полученные калориметрическим методом, отличались высокой растворимостью. Ниже приводятся данные о стабильности получаемых кристаллов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного вещества использовался порошок кристаллов парацетамола моноклинной сингонии, изготовленный «Аньцу Луань-Фармасьютикал Ко. Лтд.», Китай. Соответствует ФС 000313 (ГФ XII, Ч. 1, С. 160). Модификация кристаллов осуществлялась путем вакуумного испарения порошка из специального кварцево-

го реактора, эксклюзивно изготавливаемого авторами настоящей работы [14], при температуре 420 К с последующей конденсацией пара при комнатной температуре на медную подложку [4, 15]. Толщина образцов составляла величину ~1000 мкм. Вакуум поддерживался на уровне ~10^{-3} Па. Затем образцы помещались в специально изготовленный калориметр (аналог DSC-2) в атмосферу азота и циклически нагревались и охлаждались при скорости 10 К/мин. Температурная шкала калибровалась по точкам плавления льда (273,1 К) и индия (429,7 К), а шкала теплового потока – по теплоемкости лейкосапфира. Измерения проводились в области температур 290–390 К. Вес образцов не превышал 3 мг.

Рентгенофазовый анализ проводился на автоматизированном рентгеновском дифрактометре Smartlab 3 (прибор для проведения рентгеноструктурных исследований, Rigaku, Япония) с источником Cu-K_α-излучения. Спектры обрабатывались в программе Rigaku Smartlab Studio II. При расшифровке использовалась стандартная база данных PDF-2 и база COD.

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

Морфология поверхности исследовалась на оптическом микроскопе МБС-10 («ЛОМО-ЭЛТЕМ», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходные образцы представляли собой пленки белого цвета (рисунок 1), состоящие из молекулярных кристаллов парацетамола ромбической модификации (форма II). Их спектр дифракции рентгеновских лучей и инфракрасный спектр представлены на рисунках 2 и 3 соответственно.

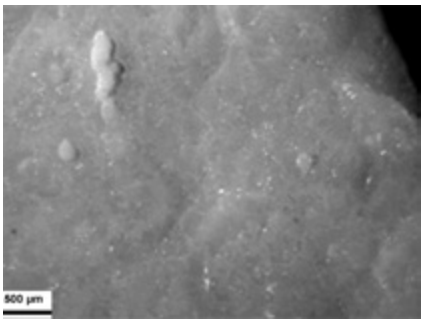


Рисунок 1. Микрофотография образца парацетамола из кристаллов ромбической модификации

Образцы помещались в калориметрическую ячейку, где осуществлялся их нагрев и производилась запись кривых дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Результаты ДСК демонстрирует рисунок 4. Кривая на рисунке 4а отражает нагрев исходного образца, а на рисунке 4б – повторный нагрев того же образца, после того как его нагрели и охладили до комнатной температуры. При нагреве исходного образца на кривой ДСК регистрировалось два эндотермических пика. Первый пик соответствовал температуре 415 К, а второй – температуре 442 К. На кривой ДСК, снятой после нагрева (рисунок 4б), низкотемпературный пик не регистрировался. При температуре 442 К происходило плавление образца. Температура плавления оказалась равной температуре плавления моноклинной формы кристаллов, что позволило предположить, что при температуре, соответствующей первому пику на кривой ДСК (рисунок 4а), происходило полиморфное превращение формы II в форму I. Предположение подтверждается спектром дифракции рентгеновских лучей от образца, снятым после его нагрева (рисунок 5). Об этом же свидетельствует инфракрасный спектр (рисунок 3). Формы I и II связаны явлением полиморфизма, поэтому фундаментальные черты спектров практически одинаковы (химическая структура является одинаковой для всех форм). Тем не менее различие наблюдается в амидных валентных колебаниях. Поэтому спектр формы II смещается в сторону высоких частот [13].

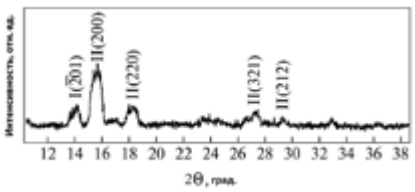


Рисунок 2. Спектр дифракции рентгеновских лучей образца парацетамола, синтезированного путем калориметрического сканирования

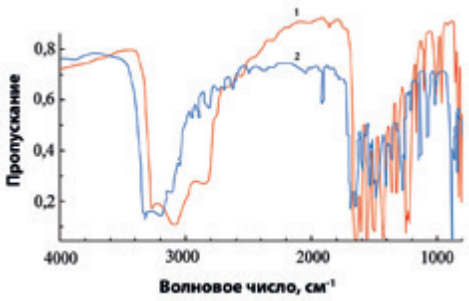


Рисунок 3. ИК-спектр исходного образца парацетамола (1) и образца, подвергнутого нагреву (2)

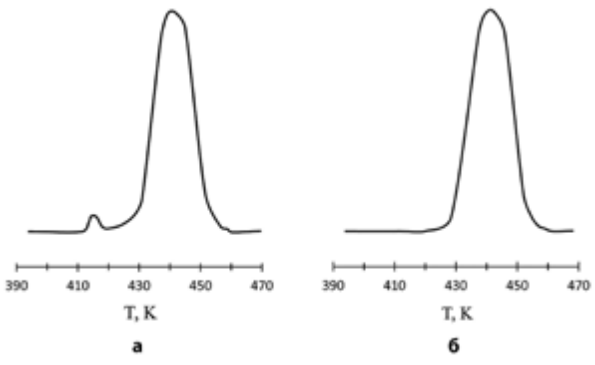


Рисунок 4. Кривые ДСК, полученные при нагревании исходного (а) и подвергнутого нагреву (б) образцов парацетамола

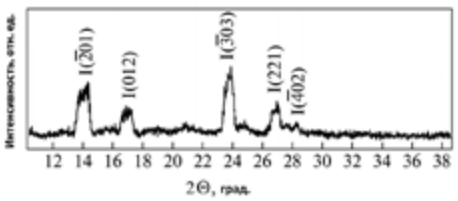


Рисунок 5. Спектр дифракции рентгеновских лучей образцов парацетамола после температурного воздействия или после механического дробления

Причиной относительно низкой температуры полиморфного превращения может быть недостаточная чистота формы II. Как можно видеть из спектра рентгеновских лучей исходного материала (рисунок 2), в нем присутствуют рефлексы, характерные для моноклинной формы [плоскость ($\bar{2}01$)]. Можно предположить, что им отвечают «примеси», оставшиеся в результате неполного фазового превращения исходного материала в форму II. В [4, 14] было показано, что формирование исследуемых образцов формы II осуществляется сложным образом в виде суперпозиции двух фазовых переходов: перехода первого рода с изменением плотности и переходом второго рода с изменением упорядоченности. Переход второго рода протекает в виде размытого фазового перехода с образованием некой «предпереходной фазы», необратимо расходуемой в процессе фазового превращения, результатом которого являются кристаллы ромбической сингонии. Очевидно, остатки «предпереходной фазы» играют роль зародышей моноклинной формы, способствующих переходу формы II в форму I при нагревании.

Наряду с исследованиями влияния температуры на устойчивость кристаллов ромбической модификации парацетамола изучалось влияние на свойства механического дробления. С этой целью исследуемые образцы помещались в шаровую мельницу, где производилось их измельчение. После измельчения порошок давал спектр дифракции рентгеновских лучей, характерный для парацетамола моноклинной формы (рисунок 5). Механическое измельчение способствовало полиморфному превращению кристаллов парацетамола ромбической модификации в моноклинную.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Калориметрическая модификация молекулярных кристаллов парацетамола моноклинной сингонии позволяет получать кристаллы ромбической сингонии, обладающие по сравнению с моноклинной кристаллической структурой повышенными технологическими параметрами. Такие кристаллы легко подвергаются пластической деформации, подходят для прямого прессования и хорошо растворяются. Однако лекарственные формы, синтезированные калориметрическим методом, обладают заметной чувствительностью к температуре и механическому дроблению.

Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют, что при использовании в технологическом процессе ромбического парацетамола следует учитывать его высокую чувствительность к температуре и механическому дроблению.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Ahmed, M.R. Shimpi, S.P. Velaga. Relationship between mechanical properties and crystal structure in cocrystals and salt of paracetamol // Drug Development and Industrial Pharmacy. 2017. V. 43. № 1. P. 89–97.
2. F. Sun, B. Xu, Y. Zhang, S. Dai, X. Shi, Y. Qia. Latent variable modeling to analyze the effects of process parameters on the dissolution of paracetamol tablet // Bioengineered. 2017. V. 8. 1. P. 61–70.
3. Y. Boumrah, I. Bouzahia, S. Bouanani, K. Khimeche, A. Dahmani. Thermodynamic and analytical studies of drugs binary systems of paracetamol mixed with pseudoephedrine. HCl, dextropropoxyphene HCl and tramadol HCl // Thermochimica Acta. 2016. V. 634. № 6. P. 48–56.
4. А.П. Беляев, В.П. Рубец, В.В. Антипов. Калориметрическое получение лекарственной формы парацетамола // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 19(2). С. 62–64.
5. J.M. Freitas, D.L.O. Ramos, R.M.F. Sousa, T.R.L.C. Paixão, M.H.P. Santana, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter. A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples // Sensors and Actuators, B: Chemical. 2017. V. 243. № 5. P. 557–565.
6. M. Taei, F. Hasanpour, M. Dinari, N. Sohrabi, M.S. Jamshidi. Synthesis of 5-[(2-hydroxynaphthalen-1-yl)diazenyl]isophthalic acid and its application to electrocatalytic oxidation and determination of adrenaline, paracetamol, and tryptophan // Chinese Chemical Letters. 2017. V. 28. № 2. P. 240–247.
7. A. Aliabadi, G.H. Rounaghi, M.H. Arbab Zavar. A new droplet-based polymeric banana electrochemical biosensor for analysis of one microliter solution of paracetamol // Sensors and Actuators, B: Chemical. 2017. V. 241. P. 182–189.
8. M.R. Carrasco-Díaz, E. Castillejos-López, A. Cerpa-Naranjo, M.L. Rojas-Cervantes. On the textural and crystalline properties of Fe-carbon xerogels. Application as Fenton-like catalysts in the oxidation ofparacetamolby H_2O_2 // Microporous and Mesoporous Materials. 2017. V. 237. № 1. P. 282–293.
9. L. Rimoldi, D. Meroni, E. Falletta, V. Pifferi, L. Falciola, G. Cappelletti, S. Ardizzone. Emerging pollutant mixture mineralization by TiO_2 photocatalysts. The role of the water medium // Photochemical and Photobiological Sciences. 2017. V. 16. P. 60–66.
10. C. Tan, N. Gao, J. Deng, L. Deng. Efficient degradation of paracetamol with nanoscaled magnetic $CoFe_2O_4$ and $MnFe_2O_4$ as a heterogeneous catalyst of peroxymonosulfate // Separation and Purification Technology. 2017. V. 175. № 3. P. 47–57.
11. V.G. Bessergenev, M.C. Mateus, I.M. Morgado, M. Hantusch, E. Burkel. Photocatalytic reactor, CVD technology of its preparation and water purification from pharmaceutical drugs and agricultural pesticides // Chemical Engineering Journal. 2017. V. 312. № 1. P. 306–316.
12. E. Szabados, G. Sági, F. Somodi, B. Maróti, D. Srankó, A. Tungler. Wet air oxidation of paracetamol over precious metal / Ti mesh monolith catalyst // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2017. V. 46. № 2. P. 364–372.
13. P. Di Martino, P. Conflant, M. Drache, J.-P. Huvenne, A.-M. Guyot-Hermann. Preparation and physical characterization of forms H and HI of paracetamol // Journal of Thermal Analysis. 1997. V. 48. P. 447–458.
14. А.П. Беляев, В.П. Рубец, И.П. Калинкин, М.Ю Нуждин. Эффекты упорядочения ансамбля дисперсных частиц в слабом поле упругих напряжений подложки при конденсации из паровой фазы в резко неравновесных условиях // Журнал физической химии. 2003. Т. 77. № 10. С. 1847–1852.
15. А.П. Беляев, В.П. Рубец, В.В. Антипов, Н.С Бордей. Особенности формирования структуры молекулярных кристаллов при вакуумном синтезе парацетамола // Журнал физической химии. 2015. Т. 89. № 4. С. 586.



Автоматический тестер **Pharmatron AutoTest 4**

- Тестирование гораздо большего числа таблеток различной формы: до 12 серий образцов
- Система SmartRake™ в комбинации с ленточным устройством подачи образцов – гарантия правильной ориентации каждого образца на протяжении всего теста
- Предельная точность результатов: твердость, масса, длина/диаметр, ширина и толщина
- Беспримерная гибкость моделирования процесса

Тестер Auto Test 4 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

КАЧЕСТВО ИМЕЕТ ЗНАЧЕНИЕ!

pharmatron
Dr. Schleuniger®

Полуавтоматический тестер прочности таблеток **Pharmatron SmartTest 50**



- Полуавтоматический анализ 5 параметров таблеток любой формы: масса, толщина, ширина, диаметр/длина и твердость
- Технология измерения твердости Dr. Schleuniger® обеспечивает стабильно точные результаты
- Система SmartAlign™ – гарантия точной ориентации образцов и автоматический поворот таблеток
- Тестирование до 23 образцов за 1 исследование
- Соответствует USP и EP, CE и EMC

Pharmatron ST50 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

Pharmaceutical® Solutions

ООО «Фармацевтические решения» — эксклюзивный представитель Sotax и Pharmatron на территории Российской Федерации

115114, Россия, г. Москва, Дербеневская наб., 7/2, оф. 429

+7 (495) 648-32-60,
8 (800) 333-70-32

www.pharmsolutions.ru
info@pharmsolutions.ru

УДК 615.074

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ДЖЕНЕРИКОВ АТОРВАСТАТИНА

О.В. Дружининская[1]*, И.Е. Смехова[1]

Резюме. Представлены результаты исследования фармацевтической эквивалентности препаратов аторвастатина в лекарственной форме таблеток, покрытых оболочкой, по тесту «Растворение». Установлено достоверное различие интенсивности высвобождения аторвастатина из таблеток разных производителей. Уже к 15-й минуте эксперимента из таблеток высвободилось от 10 до 97% аторвастатина. По подобию профилей растворения 6 препаратов из 13 изученных можно считать фармацевтически эквивалентными референтному препарату как в дозировке 10 мг, так и 20 мг. Показано, что включение в состав препарата дезинтегрантов и солюбилизаторов приводит к повышению скорости высвобождения активной фармацевтической субстанции из лекарственной формы.

Ключевые слова: тест «Растворение», фармацевтическая эквивалентность, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, аторвастатин.

USE OF DISSOLUTION TEST FOR EVALUATION OF PHARMACEUTICAL EQUIVALENCE OF ATORVASTATIN GENERICS

O.V. Druzhininskaya[1]*, I.E. Smekhova[1]

Abstract. This article shows the results of a study of pharmaceutical equivalence of atorvastatin generics using Dissolution test. A significant difference in the intensity of atorvastatin release from tablets from different manufacturers has been established. From 10 to 97% of atorvastatin was released from tablets of different manufacturers by the 15th minute of the test. In the similitude of the dissolution profiles, 6 generics out of 13 studied were pharmaceutically equivalent to the reference drug in doses 10 mg and 20 mg. It is shown that the inclusion of disintegrants and solubilizers in the formulation leads to an increase in the release rate of the active pharmaceutical substance from the dosage form.

Keywords: dissolution test, pharmaceutical equivalence, film coated tablets, atorvastatin.

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 and Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: oxana.druzhininskaya@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач здравоохранения является обеспечение импортозамещения лекарственных препаратов (ЛП) соответствующего качества и решение проблемы доступности ЛП с доказанной взаимозаменяемостью. Взаимозаменяемость препаратов для медицинского применения определяется в соответствии с правилами, утвержденными постановлением Правительства РФ от 28 октября 2015 г. При этом исследуются эквивалентность качественных и количественных характеристик фармацевтических субстанций, лекарственной формы (ЛФ), состава вспомогательных веществ (ВВ), идентичность способа введения и применения, отсутствие клинически значимых различий при проведении исследования биоэквивалентности (терапевтической эквивалентности), соответствие производителя стандартам надлежащей производственной практики [1]. Первые четыре параметра объединены понятием «фармацевтическая эквивалентность».

ЛП считаются фармацевтически эквивалентными, если они содержат одни и те же действующие вещества, имеют одинаковую ЛФ и способ введения, а также соответствуют требованиям одних и тех же стандартов. В то же время фармацевтически эквивалентные ЛП могут различаться по составу ВВ, срокам хранения и др. [2, 3].

Одним из методов оценки качества и установления фармацевтической эквивалентности твердых пероральных ЛФ является тест «Растворение», характеризующий скорость и степень высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) из ЛП в стандартных условиях [4, 5]. В настоящее время испытание «Растворение» является обязательным элементом оценки качества большинства твердых дозированных ЛФ. Видоизмененная форма теста также широко применяется для проведения сравнительных исследований

ЛП *in vitro* (сравнительный тест кинетики растворения) с целью уменьшения исследований *in vivo* [6, 7].

На растворение в значительной степени могут влиять ВВ, которые используются в производстве лекарственных средств (ЛС). Так, добавление дезинтегрантов и супердезинтегрантов существенно повышает распадаемость таблеток и высвобождение малорастворимых в воде АФС [8, 9]. С целью увеличения растворимости труднорастворимых или практически нерастворимых АФС применяются солюбилизаторы [10, 11]. ВВ данной группы могут оказывать влияние и на биодоступность ЛС [12].

Аторвастатин – гиполипидемическое средство, ингибитор гидроксиметилглутарил-кофермент-А-редуктазы, ключевого фермента, участвующего в синтезе холестерина. На отечественном фармацевтическом рынке представлено более 30 дженериков таблеток аторвастатина. Референтным препаратом является Липримар® («Пфайзер Мэнюфэкчуринг Дойчленд ГмбХ», Германия) [13].

Целью настоящего исследования явилась оценка фармацевтической эквивалентности дженериков аторвастатина референтному препарату.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны представленные на фармацевтическом рынке Санкт-Петербурга препараты аторвастатина (14 производителей) в ЛФ «таблетки, покрытые пленочной оболочкой», содержащие аторвастатин кальция, эквивалентный 10 и 20 мг аторвастатина. Исследуемые препараты условно обозначены как «XX-YY», где XX – производитель (A1-A14), YY – доза АФС в исследуемом препарате (10 или 20 мг).

Оценку фармацевтической эквивалентности по тесту «Растворение» исследуемых ЛП проводили по методике референтного препарата на тестере растворения ERWEKA DT 6 (ERWEKA GmbH, Германия), метод 2 («Лопастная мешалка», ЛМ), при скорости вращения 50 об/мин, в воде очищенной (900 мл) при температуре среды 37±0,5 °С.

Изучение кинетики растворения аторвастатина из таблеток проводили на 6 единицах каждого ЛП. В стакан помещали 1 таблетку и через 15, 30, 45 и 60 мин отбирали пробы объемом 5 мл. Выбор временных точек обусловлен необходимостью достоверного описания всего профиля растворения ЛС: точка 15 мин согласно действующим рекомендациям является обязательной при испытании ЛФ немедленного высвобождения; 30 мин и 45 мин – точки, в которых оценивается количество АФС, перешедшей в среду растворения, согласно методике референтного препарата и общей фармакопейной статье (ОФС) «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» Государственной фармакопеи XIII издания (ГФ XIII) соответственно. С



Тестере растворения ERWEKA DT 820

учетом низкой растворимости аторвастатина кальция (АФС относится ко II классу по биофармацевтической классификационной системе [14]) дополнительно была выбрана точка 60 мин, чтобы убедиться в полноте растворения АФС к концу испытания.

Пробы фильтровали через мембранные лабораторные фильтры Миллипор (размер пор 0,45 мкм), недостающий объем среды восполняли добавлением 5 мл воды очищенной. Количество перешедшего в среду растворения аторвастатина определяли спектрофотометрически при длине волны 244 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. Пробы, полученные при исследовании таблеток дозировкой 20 мг, разводили в 2 раза водой очищенной: помещали 5 мл раствора в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводили объем до метки. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца (СО).

СО: аторвастатин кальция, субстанция-порошок, содержание аторвастатина кальция 95,1% (US Pharmacopeia, кат. № 1044516, США, с. H0M533).

Приготовление раствора СО: около 12,0 мг (точная навеска) аторвастатина кальция помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 50 мл 96% этанола и доводили водой до метки.

Согласно методике референтного препарата за 30 мин в раствор должно перейти не менее 80% АФС. В соответствии с ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» количество АФС, перешедшей в среду растворения, должно составлять не менее 75% от заявленного содержания.

Статистическую обработку данных производили с использованием пакета Microsoft® Excel® 2016 MSO, версия 16.0.8730.2175. Эквивалентность профилей растворения дженериков аторвастатина оценивали, основываясь на значениях фактора сходимости (f_2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено достоверное различие интенсивности высвобождения аторвастатина из таблеток, покрытых оболочкой, разных производителей в обеих изученных дозировках при испытании по тесту «Растворение». Результаты представлены в таблицах 1–2 и на рисунках 1–2.

Таблица 1.

Усредненные значения количества аторвастатина, высвободившегося в раствор из таблеток 10 мг различных производителей (среда – вода очищенная)

ЛП, условное обозначение	Высвобождение, % к мин							
	15 мин		30 мин		45 мин		60 мин	
	Среднее	RSD	Среднее	RSD	Среднее	RSD	Среднее	RSD
Зарубежные производители:								
A1-10	94,7	1,3	86,8	1,3	82,6	2,2	94,3	1,1
A2-10	79,1	1,8	82,7	1,2	81,7	3,3	85,1	1,4
A3-10	92,4	1,3	93,6	1,4	98,0	1,5	100,0	1,4
A4-10	71,0	3,9	88,7	1,6	88,4	1,2	95,4	1,4
A5-10	84,0	1,3	86,2	1,7	89,1	1,5	90,3	1,8
A6-10	97,5	1,3	98,7	1,1	90,1	1,3	91,8	1,5
A7-10	51,1	3,7	75,2	3,3	83,6	1,8	89,1	1,9
Отечественные производители:								
A9-10	12,5	15,2	35,6	9,0	54,1	3,9	65,2	1,7
A10-10	97,8	1,1	87,4	1,5	86,5	1,3	87,6	1,4
A11-10	65,7	3,5	77,4	3,0	87,3	2,5	88,0	1,3
A12-10	82,9	1,8	85,8	1,4	88,0	1,3	96,4	1,9
A13-10	78,9	2,2	84,0	2,5	91,4	2,5	97,5	1,2
A14-10	74,0	3,0	86,0	1,6	88,0	1,4	92,0	2,3

Примечание: RSD – relative standard deviation (относительное стандартное отклонение).

Большинство изученных препаратов отвечало требованиям ОФС ГФ XIII «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (высвобождение не менее 75% АФС к 45-й минуте исследования), за исключением препарата А9 отечественного производства.

Анализ полученных профилей растворения АФС из таблеток 10 мг показал, что к 15-й минуте из таблеток А9 отечественного производства высвободилось около 10% аторвастатина, тогда как из таблеток других производителей – от 50% (А7) до 97% (А6, А10). Стоит отметить, что из препарата Липримар® за это же время перешло в раствор около 94% АФС. Однако к 30-й минуте из большинства исследуемых таблеток (производства А1-А6, А10, А12-А14) высвободилось более 80% аторвастатина, что соответствовало требованиям нормативной документации (НД) для референтного препарата, в то же время из таблеток А7, А9, А11 перешло в среду растворения менее 80% вещества (рисунок 1).

Таблица 2.

Усредненные значения количества аторвастатина, высвободившегося в раствор из таблеток 20 мг различных производителей (среда – вода очищенная)

ЛП, условное обозначение	Высвобождение, % к мин							
	15 мин		30 мин		45 мин		60 мин	
	Среднее	RSD	Среднее	RSD	Среднее	RSD	Среднее	RSD
Зарубежные производители:								
A1-20	80,4	3,2	94,1	2,0	84,2	1,3	95,8	1,6
A2-20	75,9	2,9	79,8	2,1	73,4	4,8	75,2	1,9
A3-20	79,2	1,4	81,5	1,7	82,2	2,2	92,5	1,2
A4-20	85,6	2,0	81,9	3,1	86,4	1,6	89,1	1,5
A5-20	83,6	1,4	81,4	2,0	91,3	1,3	89,6	1,5
A6-20	88,4	1,4	93,5	1,4	96,6	1,1	94,2	1,3
A7-20	65,9	2,7	74,8	2,8	80,3	2,1	85,5	1,2
A8-20	69,2	3,6	79,9	1,6	86,6	1,6	90,5	1,3
Отечественные производители:								
A9-20	49,3	4,7	64,9	2,6	73,2	2,9	77,0	1,9
A10-20	89,3	1,5	88,6	1,2	90,3	1,3	89,6	1,2
A11-20	78,1	2,3	88,9	1,2	91,1	1,5	91,3	1,3
A12-20	83,1	1,7	89,1	1,8	86,3	2,2	89,2	1,5
A13-20	70,0	1,9	90,0	1,7	98,7	1,1	99,4	1,0

Примечание: RSD – relative standard deviation (относительное стандартное отклонение).

Аналогичные результаты были получены и для таблеток 20 мг. С наибольшей скоростью аторвастатин высвобождался из таблеток А6 и А10 (индийского и российского производства). Наименьшее количество аторвастатина к концу эксперимента перешло в среду растворения из препаратов А2 и А9 (75 и 77% соответственно). При этом к 30-й минуте из таблеток А1-А6, А8, А10-А13 высвободилось более 80% аторвастатина, что соответствовало требованиям НД для референтного препарата, тогда как из таблеток А7, А9, так же как и для таблеток 10 мг, в среду растворения перешло менее 80% АФС (рисунок 2).

Таким образом, для большинства дженериков аторвастатина была установлена фармацевтическая эквивалентность по тесту «Растворение» при определении по одной временной точке (высвобождение более 80% АФС к 30-й минуте), за исключением препаратов производителей А7 и А9.

Подобие профилей высвобождения устанавливали на основании коэффициентов подобия, рассчитанные значения которых позволили сделать вывод о том, что препараты А3, А5, А6 (зарубежных производителей) и А10, А12, А13 (отечественных производителей) являются эквивалентными препарату Липримар® по тесту «Растворение» как в дозе 10 мг, так и в дозе 20 мг (таблица 3).

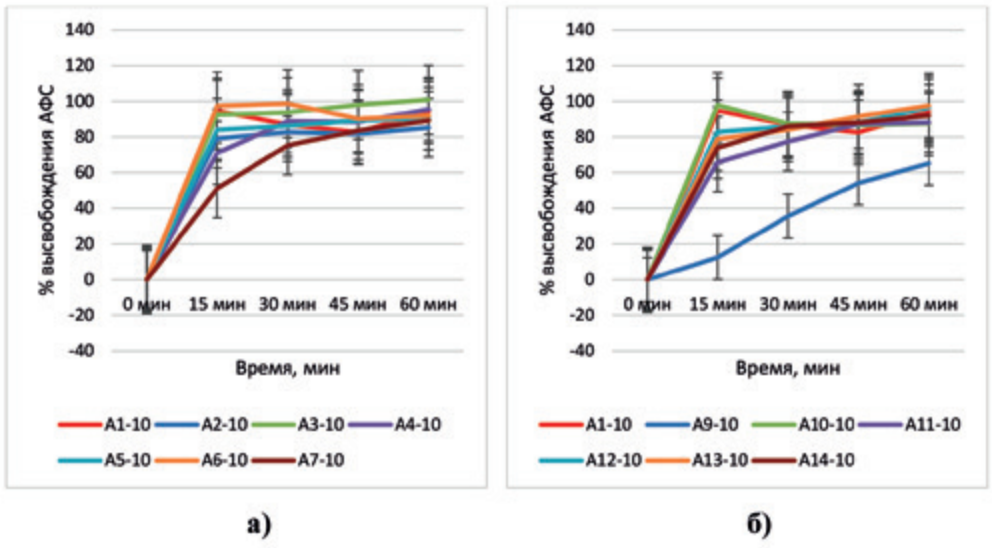


Рисунок 1. Профили высвобождения аторвастатина из таблеток 10 мг: а – зарубежных производителей; б – отечественных производителей (n=6, P=95)

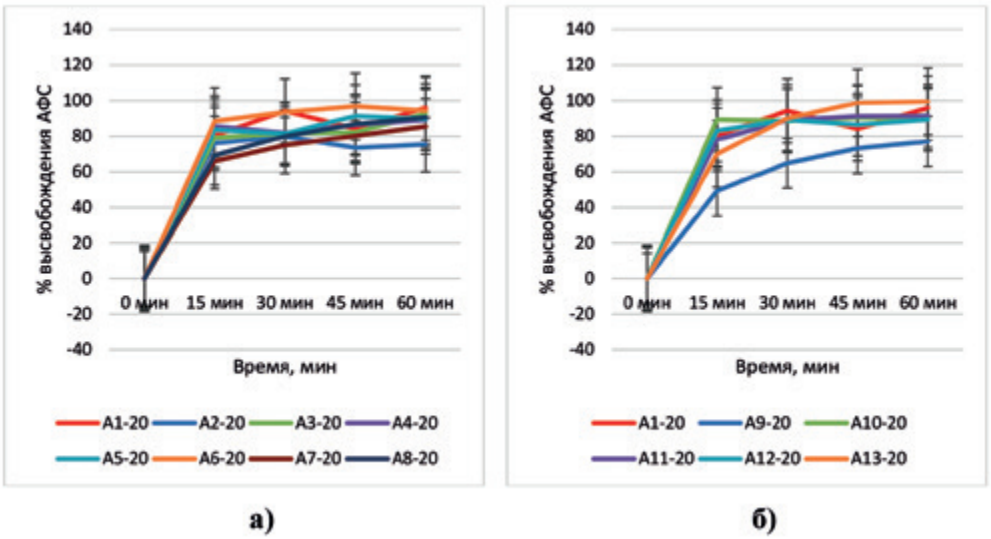


Рисунок 2. Профили высвобождения аторвастатина из таблеток 20 мг: а – зарубежных производителей; б – отечественных производителей (n=6, P=95)

Полученные результаты позволили сделать заключение о фармацевтической эквивалентности препарата А2 референтному препарату в дозировке 10 мг; в то же время не установлена фармацевтическая эквивалентность ЛП этого же производителя для таблеток с содержанием АФС 20 мг. Препараты А4 и А11, наоборот, эквивалентны в дозировке 20 мг и не эквивалентны в дозировке 10 мг. Не установлена фармацевтическая эквивалентность препарату Липримар® таблеток А7 индийского производства и А9 отечественного производства в обеих изученных дозах.

Фармацевтически эквивалентные ЛП должны иметь одинаковый или сходный состав. В связи с тем, что на высвобождение и биодоступность могут оказать влияние ВВ, нами был проведен анализ составов исследуемых препаратов аторвастатина (таблица 4).

Было установлено, что в состав таблеток входят наполнители, связывающие, разрыхляющие, смазывающие, скользящие, солюбилизирующие вещества. По данным инструкций по применению объектов исследования, составы ВВ для различных дозировок аторвастатина в таблетках большинства производителей изменяются пропорционально дозе, за исключением препарата А3 (одинаковое содержание ВВ для таблеток 10 и 20 мг); для препаратов А7-А8 количественное содержание ВВ в инструкции не приведено.

Таблица 3.

Значения коэффициентов подобия профилей высвобождения аторвастатина из таблеток 10 и 20 мг (референтный препарат – Липримар®)

ЛП, условное обозначение	Содержание аторвастатина			
	10 мг		20 мг	
	f_2	Подобие	f_2	Подобие
Зарубежные производители:				
A2	51,38	Да	42,91	Нет
A3	51,90	Да	58,75	Да
A4	45,51	Нет	56,05	Да
A5	58,76	Да	54,57	Да
A6	56,71	Да	56,18	Да
A7	32,14	Нет	43,84	Нет
A8	–	–	51,00	Да
Отечественные производители:				
A9	13,97	Нет	31,00	Нет
A10	68,33	Да	58,10	Да
A11	40,10	Нет	64,60	Да
A12	58,69	Да	67,00	Да
A13	51,38	Да	51,34	Да
A14	48,24	Нет	–	–

Примечание: «–» – таблетки такой дозировки данного производителя не исследовались.

Аторвастатин кальция практически нерастворим в воде, в связи с чем его биодоступность отмечается как невысокая (около 14%). В качестве одного из наполнителей в большинство ЛП аторвастатина введен магния карбонат или кальция карбонат. По-видимому, это связано с тем, что АФС практически не растворяется в средах с pH меньше 4, т.к. в кислой среде он переходит из формы гидроксикислоты в лактонную форму, которая в 15 раз менее растворима, чем форма гидроксикислоты [15]. Наполнители же, в свою очередь, стабилизируют форму гидроксикислоты, не давая аторвастатину кальция перейти в лактонную форму, а следовательно, повышают его растворимость.

Стоит отметить, что в состав большинства исследуемых ЛП включен аторвастатин кальция в безводной форме. В то же время некоторые производители (главным образом отечественные) используют АФС в гидратированной форме, содержащей 3 молекулы воды. Установлено, что из таких ЛП высвобождалось меньшее количество аторвастатина, что, вероятно, обусловлено меньшей растворимостью АФС в форме тригидрата по сравнению с безводной [16].

Особое внимание при анализе составов было уделено наличию в ЛП дезинтегрантов в связи с тем, что они оказывают наибольшее влияние на растворение АФС из таблеток [8, 9]. Так, большинство изученных препаратов, включая референтный, содержит супердезинтегрант кроскармеллозу натрия (A1-A8, A12, A14). В состав препаратов A5, A7, A8, A12, помимо кроскармеллозы натрия, добавлен повидон, а в A10 включены натрия карбоксиметилкрахмал и кросповидон. Кукурузный крахмал как возможный дезинтегрант используют производители препаратов A7, A11, A13.

Установлено, что для таблеток дозировкой 10 мг с наибольшей скоростью аторвастатин высвобождался из препаратов A10, A6, A1 и A3 (более 92% к 15-й минуте соответственно). По-видимому, комбинация натрия карбоксиметилкрахмала с кросповидоном (препарат A10) обеспечивала самое быстрое высвобождение АФС из таблеток.

Проведенный анализ влияния количественного содержания ВВ на высвобождение АФС из таблеток показал, что наибольшее количество кроскармеллозы натрия, содержащееся в таблетках A3 (19,2 мг) и A1 (9,0 мг), способствовало тому, что более 90% АФС высвобождалось уже к 15-й минуте испытания. А практически полное высвобождение аторвастатина из препарата A6, по-видимому, обеспечивалось наличием в составе 5,66 мг кроскармеллозы натрия и полисорбата-80 (солюбилизатор). Использование в таблетках аторвастатина крахмала в качестве дезинтегранта обеспечивало высвобождение АФС от 65,7% (A11) до 78,9% (A13) к 15-й минуте испытания. В то же время из таблеток A9, не содержащих в составе дезинтегрантов, к 15-й минуте исследования высвобождалось наименьшее количество АФС (12,5%) (таблица 5).

Аналогичные результаты были получены для препаратов аторвастатина с содержанием АФС 20 мг. Как и в случае с 10 мг, наибольшее количество АФС высвободилось к 15 мин испытания (89,3%) из таблеток A10, в состав которых был включен натрия карбоксиметилкрахмал в комбинации с кросповидоном. Более 80% аторвастатина к этому же времени перешло в среду растворения из препаратов A6, A4, A5, A12, A1, содержащих кроскармеллозу натрия (5–14,5 мг) или кроскармеллозу натрия в сочетании с повидоном. Из таблеток A9, не содержащих дезинтегранты, высвобождение АФС к 15 мин исследования (49,3%) было наименьшим (таблица 5).

Состав оболочек таблеток аторвастатина разных производителей различался незначительно, что позволило сделать вывод об отсутствии его влияния на высвобождение АФС из таблеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена фармацевтическая эквивалентность референтному препарату большинства дженериков аторвастатина по тесту «Растворение» при определении по одной временной точке. Исключение составили препараты A7 индийского производства и A9 российского производства, фармацевтическая эквивалентность которых препарату Липримар® не доказана для обеих изученных дозировок (10 и 20 мг).

Таблица 4.

Состав таблеток, покрытых пленочной оболочкой, аторвастатина, 10 и 20 мг

Состав АФС и ВВ	ЛП													
	А1	**А2**	**А3**	**А4**	**А5**	**А6**	**А7**	**А8**	**А9**	**А10**	**А11**	**А12**	**А13**	**А14**
Действующее вещество	А-Са	А-Са	А-Са	А-Са	А-Са	А-Са	А-Са-3H_2O	А-Са	А-Са	А-Са-3H_2O	А-Са-3H_2O	А-Са	А-Са-3H_2O	А-Са-3H_2O
Кальция карбонат	+	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+	+	–	+
Кальция гидрофосфата дигидрат	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Магния карбонат	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Магния оксид	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Лактозы моногидрат	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
МКЦ	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Гипролоза (гидроксипропилцеллюлоза)	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Кукурузный крахмал	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
Кросповидон	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Повидон	–	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–
Натрия карбоксиметилкрахмал (натрия крахмала гликолят)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Кроскармеллоза натрия	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	–	+
Магния стеарат	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+
Натрия стеарилфумарат	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–
Кремния диоксид коллоидный	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–
Тальк	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
Альфа-токоферола макрогола сукцинат	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Твин-80 (Полисорбат-80)	+	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Пленочная оболочка														
Оболочка	ОБ	ОБ	ОБ	ОБ	ОБ	ОБ	Н/У	ОБ	ОБ	ОБ	ОЖ	ОБ	ОБ	ОБ

Примечание: А-Са - аторвастатин кальция, А-Са-3H_2O – аторвастатина кальция тригидрат, ОБ – опадрай белый, ОЖ – опадрай желтый, Н/У – тип оболочки не установлен.

Таблица 5.

Влияние вида и количества дезинтегрантов на высвобождение аторвастатина из таблеток, покрытых оболочкой (ЛМ, 50 об/мин, среда – вода очищенная)

ЛП, усл. обозн.	Высвобождение, % к 15 мин		Наименование дезинтегранта	Кол-во ВВ, мг на 1 таб.	
	10 мг	20 мг		10 мг	20 мг
А1	94,7±1,2	80,4±2,6	Кроскармеллоза натрия	9,0	13,0
А2	79,1±1,4	75,9±2,2	Кроскармеллоза натрия	4,5	9,0
А3	92,4±1,2	79,2±1,1	Кроскармеллоза натрия	19,2	19,2
А4	71,0±2,8	85,6±1,7	Кроскармеллоза натрия	2,5	5,0
А5	84,0±1,1	83,6±1,2	Кроскармеллоза натрия	7,25	14,5
			Повидон	5,8	11,6
А6	97,5±1,3	88,4±1,2	Кроскармеллоза натрия	5,66	11,32
А7	51,1±1,9	65,9±1,8	Кроскармеллоза натрия Повидон Кукурузный крахмал	Н/У	Н/У
А8	Н/И	69,2±2,5	Кроскармеллоза натрия	–	Н/У
			Повидон	–	Н/У
А9	12,5±1,9	49,3±2,3	–	–	–
А10	97,8±1,1	89,3±1,3	Натрия карбоксиметилкрахмал	4,5	9,0
			Кросповидон	7,5	15,0
А11	65,7±2,3	78,1±1,8	Кукурузный крахмал	32,0	65,0
А12	82,9±1,5	83,1±1,4	Кроскармеллоза натрия	6,75	13,5
			Повидон	6,0	12,0
А13	78,9±1,7	70,0±1,3	Кукурузный крахмал	52,51	105,02
А14	74,0±2,2	Н/И	Кроскармеллоза натрия	7,5	–

Примечание: Н/У – количественное содержание ВВ не указано в инструкции. Н/И – таблетки такой дозировки данного производителя не исследовались.

В то же время по подобию профилей растворения лишь некоторые из препаратов были фармацевтически эквивалентными референтному препарату в обеих дозировках (препараты А3, А5, А6 зарубежных производителей и А10, А12, А13 отечественных производителей).

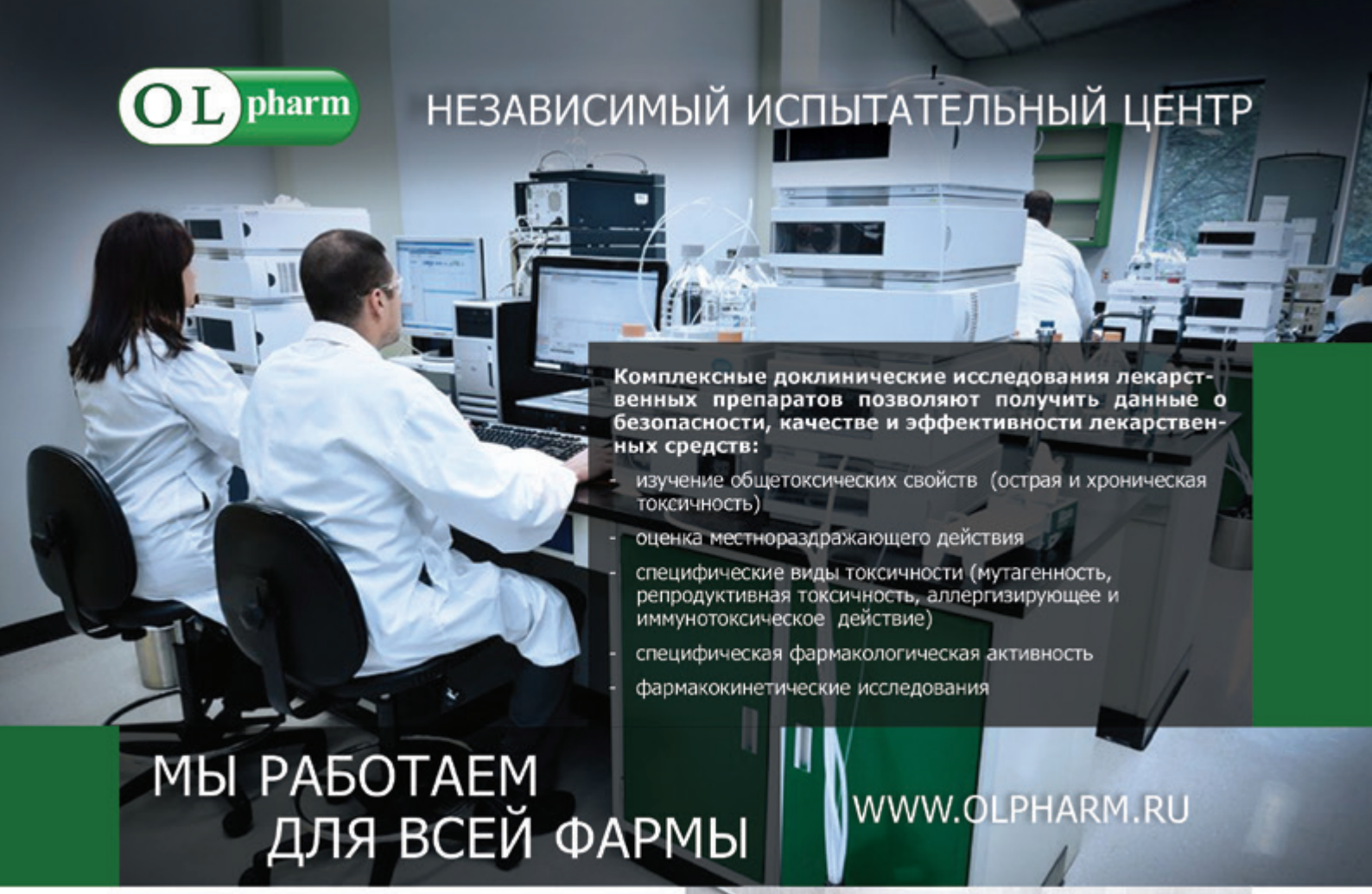
Установлено различие количественного и качественного состава ВВ препаратов аторвастатина, что позволило говорить о его влиянии на результаты теста «Растворение» исследованных таблеток. Включение в состав препарата дезинтегрантов и солюбилизаторов приводило к увеличению количества высвободившейся АФС из ЛФ. Наибольшее влияние на высвобождение аторвастатина из таблеток оказывали натрия карбоксиметилкрахмал в комбинации с кросповидоном, а также кроскармеллоза натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов (утв. постановлением Правительства РФ № 1154 от 28 октября 2015 г.).
2. Multisourse (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on registration Requirements to Establish Interchangeability / WHO Technical Report Series. 2015. № 937. Annex 7.
3. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова, И.А. Кондратьева, А.Н. Родыгина, Н.Н. Турецкова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1 (2). С. 50–61.
4. Государственная фармакопея РФ, XIII изд. Т. 2. – М. 2015. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 14.09.2017).
5. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо, 2015. 320 с.
6. А.Н. Миронов, Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев. Экспертные подходы к планированию и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведённых лекарственных препаратов в твёрдых лекарственных формах с немедленным высвобождением // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2014. № 2. С. 3–8.
7. Д.Ю. Гребёнкин, Я.М. Станишевский, И.Е. Шохин. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 166–171.
8. И.В. Воскобойникова, С.Б. Авакян, Т.А. Сокольская, И.И. Тюляев, В.Л. Багирова, В.К. Колхир, Г.С. Сакович. Применение супердезинтегрантов в твердых дозированных лекарственных формах // Фармация. 2005. № 2. С. 35–37.
9. J. Bindul, K. Balasubramaniam, V.U. Rao, D. Ray, R. Haldar, A.W. Brzeczko. Effect of superdisintegrants on dissolution of cationic drug // Dissolution Technologies. 2008. V. 15. № 2. P. 18–25.
10. П.О. Бочков, В.П. Жердев, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин, Р.В. Шевченко. Влияние высокомолекулярных вспомогательных веществ на оптимизацию фармакокинетических свойств лекарственных препаратов // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016. № 1. С. 3–11.
11. J. Goole, D.J. Lindley, W. Roth, S.M. Carl, K. Amighi, J.M. Kauffmann, G.T. Knipp. The effects of excipients on transporter mediated absorption // Int. J. Pharm. 2010. V. 393. № 1–2. P. 17–31.
12. R.L. Carrier, L.A. Miller, I. Ahmed. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability // J. Controlled Release. 2007. V. 123. № 2. P. 78–99.
13. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Electronic Orange Book. 2017. Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. URL: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/ (дата обращения 20.11.2017).
14. S. Gite, M. Chogale, V. Patravale. Development and validation of a discriminating dissolution method for atorvastatin delayed-release nanoparticles using a flow-through cell: a comparative study using USP Apparatus 4 and 1 // Dissolution Technologies. 2016. V. 23. № 2. P. 14–20.
15. M. Hoffmann, M. Nowosielski. DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin // Org. Biomol. Chem. 2008. № 6. P. 3527–3531.
16. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. PubChem database. URL: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (дата обращения 10.12.2017).

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 615.277.3; 615.076.9

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА КАБАЗИТАКСЕЛ

О.И. Авдеева[1]*, Е.В. Шекунова[1], А.А. Мужикян[1], М.Н. Макарова[1], В.Г. Макаров[1], А.Я. Хайменов[2]

Резюме. Исследование токсических свойств лекарственного препарата кабазитаксел проводили на аутбредных крысах при внутривенном введении. Оценивали токсичность при однократном и многократном еженедельном введении препарата. Отмечено, что токсические и летальные эффекты носили отсроченный характер. В остром эксперименте была рассчитана среднелетальная доза, которая для животных обоего пола составила 4,2 мг/кг. При многократном введении максимально переносимая доза составила 1,5 мг/кг, летальная – 2,5 мг/кг. Клиническая картина интоксикации характеризовалась угнетенным поведением, снижением реакции на внешние раздражители и тонуса скелетной мускулатуры, тахипноэ и диареей. Выявлено снижение потребления корма и массы тела животных. Органы-мишени токсического действия кабазитаксела: желудочно-кишечный тракт, печень, костный мозг, половая система крыс-самцов.

Ключевые слова: кабазитаксел, токсичность, доклинические исследования, крысы.

ESTIMATION OF TOXIC EFFECTS OF MEDICINAL PREPARATION OF CABAZITAXEL

O.I. Avdeeva[1]*, E.V. Shekunova[1], A.A. Muzhikyan[1], M.N. Makarova[1], V.G. Makarov[1], A.Ya. Hymenov[2]

Abstract. A study of the toxic properties of the drug cabazitaxel was carried out on outbred rats with intravenous administration. The toxicity was assessed with a single and repeated weekly administration of the drug. It was noted that the toxic and lethal effects were delayed. In an acute experiment, the mean lethal dose was calculated, which for animals of both sexes was 4.2 mg/kg. With repeated administration, the maximum tolerated dose was 1.5 mg/kg, lethal – 2.5 mg/kg. The clinical picture of intoxication was characterized by depressed behavior, decreased response to external stimuli and tonus of skeletal muscles, tachypnea and diarrhea. A decrease in feed intake and body weight of animals was detected. Target organs of toxic effect of cabazitaxel: gastrointestinal tract, liver, bone marrow, reproductive system of male rats.

Keywords: cabazitaxel, toxicity, preclinical studies, rats.

1 – АО «НПО «Дом Фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г. п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245, комната 4.34

2 –«Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.» (Индия), 115035, Россия, г. Москва, Овчинниковская наб, д. 20, стр. 1

1 – АО «NPO «HOUSE OF PHARMACY», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

2 - «Dr. Reddy's Laboratories Ltd.» (India), 20/1, Ovchinnikovskaya nab, Moscow, 115035, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: avdeeva.oi@doclinika.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

ВВЕДЕНИЕ

Кабазитаксел является противоопухолевым препаратом алкалоидной природы, разрушающим клеточную сеть микротрубочек. Связываясь с тубулином, кабазитаксел способствует сборке тубулина в микротрубочки и одновременно ингибирует их разборку. Это приводит к стабилизации микротрубочек, что в итоге ингибирует митотическую и интерфазную активность клетки. Наиболее значимой патологией, при которой целесообразно применение лекарственного препарата кабазитаксел, являются злокачественные новообразования предстательной железы, в том числе кастрационно-резистентная форма рака предстательной железы [1–3]. В структуре заболеваемости злокачественными опухолями среди мужского населения России в 2012 году рак предстательной железы занимает второе место (12,1%) после рака легкого (18,7%). В 2012 году было зарегистрировано 29082 новых случая рака предстательной железы, причем их число увеличивается с каждым годом. За 6 лет прирост абсолютного числа заболевших раком предстательной железы составил 43,8%. Средний возраст больных составил 70,8 лет [4]. По статистике у 10-20% больных раком предстательной железы в течение 5 лет развивается кастрационно-резистентная форма заболевания [2]. В связи с широким распространением и постоянным ростом среди мужского населения заболеваний предстательной железы неопластической природы актуальной проблемой для медицины является подбор наиболее эффективных противоопухолевых препаратов, обладающих минимальным токсическим эффектом для организма больного при длительном применении.

В 2010 году возможности лекарственного лечения метастатической кастрационно-резистентной формы рака предстательной железы значительно расширились с появлением новых препаратов как цитостатического, так и гормонального действия. В России зарегистрированы пока только два препарата, показавших увеличение общей выживаемости пациентов, – кабазитаксел и абиратерона ацетат [1]. Кабазитаксел был разработан в лаборатории компании «Санофи Авентис» и одобрен для использования в клинической практике FDA 17 июня 2010 и 21 января 2011 Европейским агентством по лекарственным средствам.

В связи с недавним появлением указанных препаратов имеется мало сведений об их эффективности и безопасности, в частности сведения о токсических дозах в доклинических исследованиях скудны и противоречивы. Согласно литературным данным MSDS, $ЛД_{50}$ кабазитаксела при внутрижелудочном введении крысам составляет 500 мг/кг [5]. По другим данным, однократное внутривенное введение препарата в дозах 2,5–10 мг/кг вызывало гибель крыс [6, 7].

Целью настоящего исследования явилось изучение общетоксических свойств кабазитаксела при однократном и многократном внутривенном введении аутбредным крысам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемый объект кабазитаксел («Санофи Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия) использовали в лекарственной форме концентрата для приготовления инфузий для внутривенного введения, который для получения экспериментальных доз разводили физиологическим раствором хлорида натрия. Эксперименты были проведены на самцах и самках аутбредных крыс (АО «НПО «Дом Фармации», ветеринарное удостоверение 247 № 0008260), получавших кабазитаксел внутривенно однократно и многократно еженедельно в соответствии с рекомендациями по проведению доклинических исследований [8]. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Масса животных к моменту начала каждого эксперимента составляла 200–250 г. Количество животных в каждом эксперименте было достаточным для статистической обработки полученных данных и минимальным с точки зрения биоэтических принципов. Исследование выполнено в соответствии с принципами GLP и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (одобрено на заседании биоэтической комиссии – заключение № 2.39/15).

С целью оценки токсичности при однократном введении (острая токсичность) препарат животным вводили однократно, при выборе доз руководствовались данными литературы о летальных дозах для изучаемого объекта [5–7]. Дозы для введения составили: 2,3; 3,1; 4,1; 5,5; 7,3 мг/кг. В каждой группе было по 5 крыс каждого пола. Объем для введения составил 5 мл/кг.

В экспериментах по изучению токсичности при многократном введении (хроническая токсичность) препарат вводили внутривенно многократно, еженедельно, курс введения составил 4 инъекции. Дозы для введения были определены результатами изучения острой токсичности, а также литературными данными о максимально переносимых дозах для крыс [6, 7] и составили 0,5; 1,5; 2,5 мг/кг, что соответствует 0,13 ВТД, 0,39 ВТД, 0,65 ВТД (ВТД – высшая терапевтическая доза). В каждой группе было по 10 крыс каждого пола. Объем для введения составил 5 мл/кг.

Путь введения объекта исследования был выбран в соответствии с клиническим применением кабазитаксела – внутривенным.

В ходе экспериментов массу тела животных регистрировали непосредственно перед началом исследования и далее еженедельно. Индивидуальное поведение каждой отдельной крысы изучали в тесте «Открытое поле» в конце периода наблюдений (14-й день) при оценке токсичности при однократном введении и по окончании курса введения препарата и отсроченного наблюдения (28-й и 57-й дни соответственно) при оценке токсичности в условиях многократного введения. В экспериментах по изучению токсичности при многократном введении на 28-й и 57-й дни был произведен забор крови из хвостовой вены для анализа гематологических показателей.

Плановую эвтаназию проводили на 15-й день после однократного введения, при исследовании токсичности при многократном введении – на 29-й и 58-й дни. Эвтаназию осуществляли помещением животного в CO_2-камеру, далее проводили некропсию с последующим макроскопическим анализом внутренних органов, проводили их взвешивание с целью установления процентного соотношения массы каждого органа к массе тела данного животного. В экспериментах по изучению токсичности при многократном введении на 29-й и 58-й дни проводили забор крови из полостей сердца для оценки биохимических показателей, забор костного мозга для оценки миелограмм, а также забор органов для гистологического исследования. Материал, полученный от животных, был зафиксирован в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч и подвергнут стандартной гистологической обработке с этапами вырезки органов, промывки в проточной воде, дегидратации в изопропаноле возрастающей концентрации и заливки в парафин [9]. Из парафиновых блоков были изготовлены срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином (ГЭ) для обзорной микроскопии, а также иммуногистохимически (ИГХ) с выявлением экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) иммунопероксидазным методом. В исследовании использовались мышиные моноклональные антитела к PCNA (производитель – ООО «ПраймБиоМед», Рос-

сия), клон PC10, в разведении 1:100, в качестве системы визуализации для первичных антител была использована универсальная поливалентная система № 1 с HRP/DAB (производитель – ООО «ПраймБиоМед», Россия). Окрашивание проводили согласно предоставленному производителем протоколу.

Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения пакета статистических программ Statistica 10.0 (StatSoft, Россия). Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимые от доз летальные эффекты тестируемого препарата кабазитаксел после однократного внутривенного введения представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Летальные эффекты (пало/всего) кабазитаксела после однократного внутривенного введения крысам

Доза препарата, мг/кг	0	2,3	3,1	4,1	5,5	7,3
Кабазитаксел, самцы	0/5	0/5	1/5	3/5	3/5	5/5
Кабазитаксел, самки	0/5	0/5	1/5	2/5	4/5	5/5

Полученные данные согласуются с литературными [6], где указано, что летальные дозы для мышей, крыс и собак составили 40, 5 и 1 мг/кг соответственно, а высшие нелетальные дозы для крыс – 2,5 мг/кг, собак – 0,5 мг/кг, для мышей была определена $ЛД_{10}$, которая составила 40 мг/кг.

Полученные межвидовые различия обусловлены, на наш взгляд, разностью площади поверхности тела животных, величина которой учитывается при дозировании противоопухолевый средств в клинической практике.

Летальные дозы, полученные экспериментально, представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Летальные дозы после внутривенного введения кабазитаксела (доверительный интервал 95%)

Летальные дозы	Самцы	Самки
$ЛД_{10}$	2,7 (1,01÷3,50)	2,9 (1,29÷3,64)
$ЛД_{16}$	3,0 (1,29÷3,73)	3,1 (1,58÷3,84)
$ЛД_{50}$	4,2 (3,14÷5,58)	4,2 (3,25÷5,41)
$ЛД_{84}$	6,0 (4,80÷13,32)	5,6 (4,62÷11,01)

Клиническая картина интоксикации в ближайшие часы после внутривенного введения препарата не регистрировалась, все животные были в удовлетворительном состоянии. Отсроченность токсических эффектов, по-видимому, связана с высоким процентом связывания кабазитаксела с белками плазмы, который для крыс составляет 95,5% [6]. Первые признаки токсического влияния препарата на крыс были зафиксированы на 5-е сутки эксперимента. Летальность животных также была отсроченной – летальные эффекты наблюдали с 7-го по 14-й дни исследования. Динамика токсических и летальных эффектов препарата представлена в таблице 3.

Таблица 3.

Динамика токсических и летальных эффектов после однократного внутривенного введения кабазитаксела, % от общего количества живых животных

Доза, мг/кг	День эксперимента	Признак интоксикации							
		Угнетение поведения и реакции на раздражители	Снижение тонуса мускулатуры	Тахипноэ	Вынужденное лежание	Выделения из глаз	Профузная диарея	Истощение	Гибель
2,3	5-й	0	0	0	0	0	0	0	0
	10-й	40	20	20	0	0	0	20	0
	14-й	0	0	0	0	0	0	0	0
3,1	5-й	0	0	0	0	0	0	0	0
	10-й	60	40	40	60	0	0	30	0
	14-й	38	38	0	0	0	0	100	20
4,1	5-й	50	0	50	50	0	0	0	0
	10-й	88	88	100	100	63	0	63	20
	14-й	40	40	40	40	40	0	100	50
5,5	5-й	100	0	100	100	0	0	0	0
	10-й	100	100	100	100	75	75	100	60
	14-й	67	67	67	67	67	0	100	70
7,3	5-й	100	0	100	100	0	0	0	0
	10-й	100	100	100	100	100	67	100	70
	14-й	–	–	–	–	–	–	–	100

У всех животных, получивших препарат в дозах 5,5 мг/кг и 7,3 мг/кг, на 5-й день эксперимента регистрировали угнетение поведения, выраженное снижение реакции на внешние раздражители, в том числе при взятии на руки, учащенное дыхание, крысы находились в позе вынужденного лежания. Аналогичные симптомы были зарегистрированы у 50% животных, получивших препарат в дозе 4,1 мг/кг. При введении более низких доз препарата проявлений интоксикации на 5-й день не отмечено.

С 7-го дня исследования вместе с описанными симптомами у 50% животных наблюдали снижение тонуса скелетной мускулатуры, отмечали обильные кровянистые выделения из глаз крыс, получивших препарат в дозе 7,3 мг/кг, спорадически наблюдалась профузная диарея. У животных, получивших средние дозы препарата, выделения из глаз были менее интенсивными, а в группах, получивших минимальную дозу препарата, – отсутствовали. Начиная с 8-го дня эксперимента отмечали нарастающую дозозависимую клиническую картину интоксикации, наиболее выраженную среди животных, получивших препарат в средних дозах и выше. Пик выраженности токсических эффектов пришелся на 9-й и 10-й дни исследования, после 10-го дня отмечали снижение проявлений интоксикации, однако полное купирование интоксикации бы-

ло зафиксировано только у животных, получивших препарат в минимальной дозе. Следует отметить, что сразу после дебюта первых симптомов интоксикации животные практически не употребляли корм и у всех выживших особей, кроме группы с минимальной дозой, к концу исследования наблюдали истощение.

Гибель животных при многократном введении кабазитаксела была зафиксирована в группе, получавшей препарат в дозе 2,5 мг/кг, и составила 40% самцов и 40% самок, при введении меньших доз летальность отсутствовала. Первые случаи гибели были зарегистрированы на 8-й день, то есть после 2-й инъекции препарата.

Картина интоксикации при многократном введении препарата была аналогичной зарегистрированной при изучении токсичности при однократном введении. Носила дозозависимый «волнообразный» характер. Проявлялась угнетением поведения, снижением реакции на раздражители и снижением тонуса скелетных мышц при введении препарата в дозах 0,5 и 1,5 мг/кг и выраженным угнетением поведения, учащенным дыханием, позой вынужденного лежания и серозными выделениями из глаз вместе с уже описанной симптоматикой при введении максимальной дозы препарата. Пик интоксикации приходился на третьи сутки после каждого введения препарата, начиная со второй инъекции, то есть, так же как и после однократного введения, картина интоксикации была отсрочена. К следующему введению препарата (через неделю) проявления интоксикации полностью исчезали. По результатам наблюдения за животными в течение 4 недель после отмены введения препарата был сделан вывод об обратимости выявленных токсических эффектов.

На фоне многократного введения препарата отмечали снижение массы тела по сравнению с группой контроля. Начиная с 7-го дня исследования крысы практически не набирали массу. В период отсроченного наблюдения у крыс экспериментальных групп наблюдали незначительный прирост массы тела, тем не менее масса тела крыс, получавших препарат, была достоверно ниже показателя контрольных групп.

Результаты тестирования в установке «Открытое поле» показали снижение локомоторной и исследовательской активности у животных, получивших препарат однократно внутривенно в дозах 3,1–5,5 мг/кг. Влияния на индивидуальное поведение экспериментальных животных препарата в дозах 0,5–2,5 мг/кг при 4-кратном еженедельном введении не зарегистрировано.

Анализ данных гематологических показателей периферической крови экспериментальных животных выявил статистически значимое снижение количества эритроцитов, уровня гемоглобина и гематокрита в сравнении с контрольной группой у животных, получавших препарат в дозе 2,5 мг/кг, на 28-й день эксперимента (таблица 4). По количеству лейкоцитов, их процентному соотношению и уровню тромбоцитов отличий от контрольной группы не обнаружено. При исследовании периферической крови на 57-й день отличий от контрольных групп не выявлено.

Таблица 4.

Влияние многократного внутривенного введения кабазитаксела на гематологические показатели крови крыс на 28-й день исследования

Исследуемые показатели		Контрольная группа	Доза кабазитаксела		
			0,5 мг/кг	1,5 мг/кг	2,5 мг/кг
Самцы					
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	M±SEM	7,3±0,3	7,2±0,4	6,9±0,4	5,4±0,4*
	SD	1,0	1,2	1,2	0,9
	n	10	10	10	6
Гемоглобин, г/л	M±SEM	140±3,5	140±3,9	136±4,1	121±3,9*
	SD	10,9	12,4	12,9	9,5
	n	10	10	10	6
Гематокрит, %	M±SEM	38±0,9	38±1,1	37±1,0	33±1,0*
	SD	2,9	3,3	3,3	2,4
	n	10	10	10	6
Самки					
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	M±SEM	7,2±0,3	6,8±0,3	6,7±0,2	5,4±0,3*
	SD	0,8	1,0	0,8	0,7
	n	10	10	10	6
Гемоглобин, г/л	M±SEM	141±3,0	139±3,1	137±2,9	124±3,6*
	SD	9,5	9,6	9,0	8,7
	n	10	10	10	6
Гематокрит, %	M±SEM	38±0,9	37±0,8	37±0,8	33±0,9*
	SD	2,8	2,4	2,5	2,1
	n	10	10	10	6

Примечание: *статистически значимые отличия от контрольной группы (критерий Тьюки).

Проведенные ранее исследования также обнаружили гематологические изменения при 5-дневном ежедневном введении крысам в дозах больше 0,25 мг/кг и при курсовом введении крысам 1 раз в 3 недели в дозах больше 1 мг/кг [6]. Также была отмечена обратимость выявленных изменений.

Анализ клеточного состава костного мозга, проведенный на 29-й день исследования, показал наличие признаков угнетения эритропоэза и, как следствие, сдвиг лейко-эритробластического отношения в группах, получавших препараты в дозе 2,5 мг/кг. При исследовании структуры костного мозга на 58-й день выявлено наличие сдвига лейко-эритробластического отношения в группах, получавших препараты в дозе 2,5 мг/кг, что свидетельствовало о неполном восстановлении эритропоэза за 4 недели отсроченного наблюдения (таблица 5).

Таблица 5.

Влияние многократного внутривенного введения кабазитаксела на клеточный состав костного мозга крыс

Исследуемые показатели		Контрольная группа	Доза кабазитаксела		
			0,5 мг/кг	1,5 мг/кг	2,5 мг/кг
29-й день					
Самцы					
Все эритрокариоциты, %	M±SEM	23±0,9	22±1,5	19±0,6	15±0,6*
	SD	2,1	3,3	1,3	1,0
	n	5	5	5	3
Лейко-эритробластическое отношение	M±SEM	2,1±0,1	2,3±0,2	2,6±0,1	3,3±0,1*
	SD	0,2	0,5	0,3	0,2
	n	5	5	5	3
Самки					
Все эритрокариоциты, %	M±SEM	22±1,2	21±0,9	22±1,0	16±1,2*
	SD	2,7	1,9	2,2	2,1
	n	5	5	5	3
Лейко-эритробластическое отношение	M±SEM	2,0±0,1	2,4±0,1	2,3±0,1	3,3±0,2*
	SD	0,2	0,2	0,3	0,4
	n	5	5	5	3
58-й день					
Самцы					
Все эритрокариоциты, %	M±SEM	22±1,0	21±0,5	20±0,5	19±0,3
	SD	2,2	1,2	1,1	0,5
	n	5	5	5	3
Лейко-эритробластическое отношение	M±SEM	2,1±0,1	2,3±0,1	2,5±0,1	2,7±0,1*
	SD	0,2	0,1	0,3	0,1
	n	5	5	5	3
Самки					
Все эритрокариоциты, %	M±SEM	21±0,3	23±1,4	23±1,3	18±0,3
	SD	0,7	3,2	2,9	0,6
	n	5	5	5	3
Лейко-эритробластическое отношение	M±SEM	2,4±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	2,8±0,03*
	SD	0,1	0,2	0,3	0,05
	n	5	5	5	3

Примечание: *статистически значимые отличия от контрольной группы (критерий Тьюки).

Полученные данные в плане влияния на костный мозг согласуются с литературными [6]. Микроскопические изменения в костном мозге были определены после 5-дневного ежедневного введения крысам в дозах больше 0,25 мг/кг и после курсового введения крысам 1 раз в 3 недели в дозах больше 1 мг/кг. Однако изменения были характерны для миелоидного ростка.

Анализ данных биохимических показателей периферической крови экспериментальных животных выявил увеличение в 1,5 раза активности аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сравнении с контрольной группой у животных, получавших кабазитаксел в дозах 1,5 и 2,5 мг/кг, на 29-й день эксперимента. При анализе биохимических показателей крови на 58-й день отличий от контрольной группы не выявлено, что свидетельствует об обратимости изменений. Проведенные ранее доклинические исследования показали аналогичные изменения [6].

При макроскопическом исследовании внутренних органов животных при плановой и внеплановой некропсии после однократного внутривенного введения препарата выявлены дефекты слизистой оболочки желудка в 10% случаев: гиперемия, геморрагический гастрит, эрозивно-язвенные поражения. У 25% крыс было отмечено развитие катарального и катарально-геморрагического энтерита. У 5% крыс обнаружена дистрофия печени.

При вскрытии и патоморфологическом исследовании крыс, подвергшихся плановой эвтаназии на 29-й и 58-й дни исследования токсичности при многократном введении, макроскопических изменений в структуре внутренних органов не выявлено.

При анализе гистологических срезов, полученных от животных на 29-й и 58-й дни, было выявлено развитие подострого колита и гиперплазия лимфоидной ткани толстой кишки (рисунок 1). У всех самцов в группах, получавших кабазитаксел в дозах 1,5 мг/кг и 2,5 мг/кг, отмечались умеренные дегенеративные изменения в семенниках, сопровождающиеся гипоплазией и аплазией эпителия извитых канальцев (рисунок

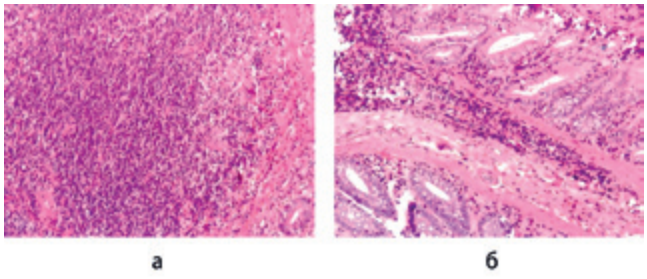


Рисунок 1. А – Срез толстой кишки крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 1,5 мг/кг. Гиперплазия лимфоидной ткани толстой кишки. Ув.100. Окраска ГЭ. 29-й день.
Б – Срез толстой кишки крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 2,5 мг/кг. Диффузная лимфоплазмоцитарная инфильтрация слизистой с развитием микроскопической картины колита. Ув.100. Окраска ГЭ. 29-й день

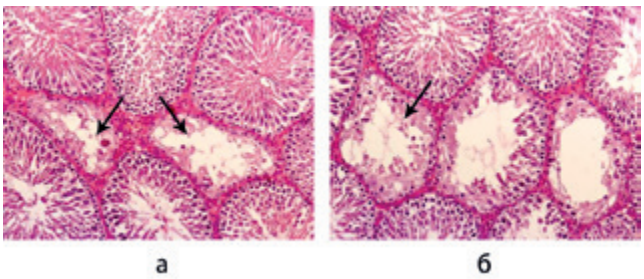


Рисунок 2. А – Срез семенника крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 1,5 мг/кг. Аплазия эпителия извитых канальцев (указано стрелками). Ув.100. Окраска ГЭ. 29-й день.
Б – Срез семенника крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 2,5 мг/кг. Гипоплазия эпителия извитых канальцев (указано стрелками). Ув.100 Окраска ГЭ. 29-й день

2). Последующее иммуногистохимическое исследование с выявлением экспрессии ядерного антигена PCNA также показало снижение пролиферативной активности клеток сперматогенного эпителия в некоторых канальцах (рисунок 3). В остальных органах и тканях морфологических изменений не обнаружено.

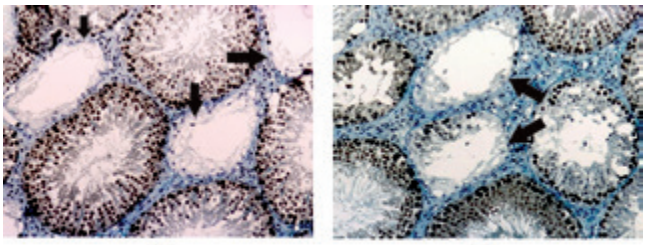


Рисунок 3. А – Срез семенника крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 1,5 мг/кг. Снижение экспрессии маркера пролиферации PCNA в некоторых извитых канальцах (указано стрелками). Продукты ИГХ-реакции окрашены в коричневый цвет. Докраска толлуидиновым синим. Ув.100. 29-й день.
Б – Срез семенника крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 2,5 мг/кг. Снижение экспрессии маркера пролиферации PCNA в некоторых извитых канальцах (указано стрелками). Продукты ИГХ-реакции окрашены в коричневый цвет. Докраска толлуидиновым синим. Ув.100. 29-й день

В рамках проведенного эксперимента по изучению токсичности при многократном введении у препарата в дозе 2,5 мг/кг было выявлено умеренное местнораздражающее действие на хвостовую вену и прилегающую клетчатку в месте инъекций, однако наблюдаемые изменения были обратимы и фиксировались в минимальной степени выраженности по истечении периода отсроченного наблюдения за животными (рисунок 4).

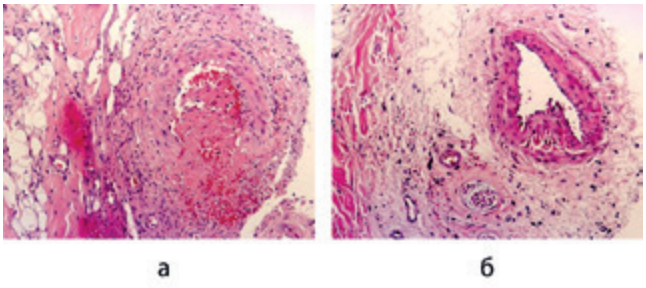


Рисунок 4. А – Срез хвостовой вены крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 2,5 мг/кг. Формирование крупного пристеночного тромба. Периваскулярная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Ув.100. Окраска ГЭ. 29-й день.
Б – Срез хвостовой вены крысы, получавшей кабазитаксел в дозе 2,5 мг/кг. Слабо выраженная периваскулярная лимфоплазмоцитарная инфильтрация. Ув.100. Окраска ГЭ. 58-й день.

Выявленные патоморфологические изменения сопоставимы с литературными данными, согласно которым патологические изменения обнаруживались в печени, ЖКТ, лимфоидной системе, мужской репродуктивной системе [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам изучения общетоксических свойств кабазитаксела на аутбредных крысах при внутривенном введении были сделаны следующие выводы.

1. Кабазитаксел по показателям острой токсичности отнесен ко 2 классу умеренно токсичных веществ по ГОСТ 12.1.007-76 (2 мг/кг<$ЛД_{50}$ в/в<20 мг/кг) или ко 2 классу опасности по OECD (0,7 мг/кг<$ЛД_{50}$ в/в<7 мг/кг) [10].
2. Максимально переносимая доза при многократном еженедельном введении – 1,5 мг/кг, летальная – 2,5 мг/кг.
3. Органы-мишени токсического действия препарата: желудочно-кишечный тракт, эритроцитарный росток костного мозга, лимфоидная ткань, печень, семенники.
4. Оптимальный подбор режима введения препарата (в случае крыс 1 раз в неделю) позволяет достичь значительного восстановления организма к следующему введению, что повысит безопасность химиотерапии для пациентов.
5. Для подтверждения профиля безопасности кабазитаксела целесообразно проведение исследования токсичности на альтернативном виде животных – кроликах.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Маркова. Современные возможности лекарственного лечения кастрационно-резистентного рака предстательной железы: дисс. ... к.м.н. – М. 2015. 119 с.
2. А.К. Носов, Н.А Воробьев. Гормонорезистентный рак предстательной железы // Практическая онкология. 2008. Т. 9. № 2. С. 104–116.
3. Э.К. Возный, А.Ю. Попов, М.М Галкин. Таксаны в терапии рака предстательной железы // Онкология, гематология и радиология. 2011. № 2. С. 12–17.
4. И.Г. Русаков, А.А Грицкевич. Современные представления о лечении кастрационно-резистентного рака предстательной железы // Практическая онкология. 2012. Т. 13. № 3. С. 156–165.
5. FDA одобрило кабазитаксел в дозе 20 мг/м^2 в лечении больных раком предстательной железы. URL: http://www.drugbank.ca/system/msds/DB06772.pdf?1367016313 (дата обращения 15.06.2017).
6. P. Vrignaud et al. Preclinical profile of cabazitaxel // Drug Design, Development and Therapy. 2014. № 8. P.1851–1867.
7. Assessment Report For Jevtana (cabazitaxel). Procedure No.: EMEA/H/C/002018 / European Medicine Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. 66633/2011. 20 January 2011.
8. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1. / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: ФГБУ «НЦЭМСП», 2012. 942 с.
9. А.А. Мужикян, М.Н. Макарова, Я.А. Гущин. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 103–109.
10. И.В. Березовская. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 3. С. 32–34.

УДК (615.276+615.281.9+57.084.1); 547.582

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОГАЛОГЕНИДОВ АМИДРАЗОНОВ

А.С. Сенина[1]*, А.В. Москвин[1], С.В. Гурина[1], Е.Л. Авенирова[1]

Резюме. Изучена биологическая активность ряда гидрогалогенидов N'-арилбензолкарбоксимидогидразидов *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli* и грибов *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*, а также противовоспалительная и анальгезирующая активность *in vivo*. Гидрохлорид N'-(4-нитрофенил)бензолкарбоксимидогидразид (**3c**) проявляет выраженную противомикробную активность в отношении *St. aureus*, гидрохлорид 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразид (**3b**) эффективен в отношении грибов *C. albicans* и *A. brasiliensis*. Острая токсичность полученных соединений для мышей при внутрижелудочном введении – от 1000 до 2000 мг/кг и при внутрибрюшинном введении – от 200 до 400 мг/кг. Гидрохлорид 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразид (**3b**) обладает двумя видами активности – противовоспалительной и анальгезирующей, значения которых не превышают аналогичные показатели для препаратов сравнения.

Ключевые слова: противогрибковая активность, противомикробная активность, анальгезирующая активность, противовоспалительная активность, острая токсичность, гидрогалогениды N'-арилбензолкарбоксимидогидразидов.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF HYDROGENALIDES OF AMIDEZONE

A.S. Senina[1]*, A.V. Moskvin[1], S.V. Gurina[1], E.L. Avinirova[1]

Abstract. The biological activity of a number of N'-arylbenzenecarboximidohydrazide hydrohalides *in vitro* against *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli* and *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* fungi, as well as anti-inflammatory and analgesic activities *in vivo* has been studied. N'-(4-nitrophenyl)benzenecarboximidohydrazide hydrochloride (**3c**) exhibits marked antimicrobial activity against *St. aureus*, 4-nitro-N'-phenylbenzenecarboximidohydrazide hydrochloride (**3b**) is effective against *C. albicans* and *A. brasiliensis* fungi. Acute toxicity of the obtained compounds for mice with intragastric administration was 1000 to 2000 mg/kg and intraperitoneal administration was 200 to 400 mg/kg. 4-nitro-N'-phenylbenzenecarboximidohydrazide hydrochloride (**3b**) has anti-inflammatory and analgesic activities that do not exceed that of the reference preparations.

Keywords: antifungal activity, antimicrobial activity, analgesic activity, anti-inflammatory activity, acute toxicity, hydrohalides of N'-arylbenzenecarboximidohydrazides.

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

2 – St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical Academy, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: anna.senina@pharminnotech.com

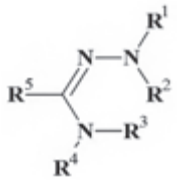
ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным является поиск и создание новых безопасных и эффективных лекарственных средств в отношении широкого спектра микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний. Это обусловлено тем, что бактерии способны находить все новые способы сопротивления воздействию лекарственных средств, что ведет к увеличению резистентности многих патогенных микроорганизмов к широко используемым антимикробным препаратам, и на генетическом уровне передают эту способность новым поколениям бактерий [1].

Известно, что производные амидразонов проявляют антибактериальную, нейролептическую, гипотензивную, противовирусную, спазмолитическую активность [2].

Амидразонывыдоступны, высокореакционноспособны, являются хорошими полупродуктами для синтеза новых гетероциклических соединений, обладающих широким спектром биологической активности (противомикробной, противовоспалительной, анальгезирующей) [3].

Амидразонами называют соединения, характеризующиеся структурной формулой, представленной ниже, где R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 могут быть представлены как атомами водорода, так и разнообразными заместителями [3].



В настоящее время известны амидразоны, содержащие в своем составе алифатические, ароматические и гетероциклические фрагменты. Однако известные методы их получения немного-

численны и имеют ряд недостатков (низкий выход, трудность выделения целевых веществ и их очистки).

Цель исследования – изучить биологическую активность полученных производных амидразонов и выявить наиболее перспективные соединения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые вещества

Нами был синтезирован ряд производных амидразонов согласно схеме превращений, представленной на рисунке 1. В качестве исходных соединений были использованы гидразоноилхлориды **(1, a-d)**, как наиболее доступные соединения из соответствующих коммерческих гидразидов без дополнительной очистки. Амидразоны были получены в виде гидрогалогенидов **(3, a-d)** (гидрогалогениды замещенных N'-арилбензолкарбоксимидогидразидов) путем аминирования гидразоноилхлоридов **(1, a-d)** [4].

Полученные соли амидразонов **(3, a-d)** представляют собой твердые кристаллические вещества желтого или оранжевого цвета, хорошо растворимые в воде. Выходы продуктов составили от 80–85% [4].

Состав, строение и индивидуальность полученных соединений установлена с помощью физико-химических методов анализа (спектрометрия ^{1}H, ^{13}C-ЯМР, ИК-спектроскопия и масс-спектрометрия, тонкослойная хроматография, элементный анализ) [4].

Предварительно был проведен компьютерный прогноз возможных видов биологической активности производных амидразонов с помощью специализированных компьютерных программ: PASS, PASS – PASS-Targets (ver. 2014, создана В.В. Поройковым и Д.А. Филимоновым) [5] и AutoDockVina (http://vina.scripps.edu/).

Компьютерная программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) Refined 2014 позволяет предсказать спектр биологической активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей «структура – активность» в обучающей выборке [6].

Программа PASS Targets предназначена для компьютерной оценки взаимодействия органических соединений с белками-мишенями, представляющими все известные в настоящее время фармакологически значимые классы белков, на основе информации, представленной в базе данных ChEMBL (ver. 19) [7].

Одним из эффективных способов поиска новых биологически активных веществ является молекулярный докинг. С помощью программы AutoDockVina можно определять структуру активных центров белков, изучать возможность связывания лиганда с белком, оценивать комплементарность (структурную и химическую) белка и лиганда, находить энергию связывания лиганда в комплексе с белком [8].

Для экспериментального исследования антибактериальной активности *in vitro* в качестве тест-культур использовали следующие штаммы микроорганизмов: *St. aureus* ATCC 6538-P, *B. cereus* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922. Для изучения противогрибковой активности использовали тест-культуры дрожжей рода *C. albicans* NCTC 885-653 и мицелиального гриба *Asp. brasiliensis* ATCC 16404 [9].

Исходные суспензии клеток бактерий и дрожжей готовили по стандарту мутности 1 млрд клеток/мл. Для получения спор мицелиального гриба *Asp. brasiliensis* культуру готовили в соответствии с ГФ XIII. Культуру *Asp. brasiliensis* высевали на плотную среду Сабуро и инкубировали при температуре (22,5±2,5) °С в течение 5–7 суток. Споры *Asp. brasiliensis* смывали со среды фосфатным буферным раствором с 0,05% твина-80. Определяли количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева, и получали суспензию спор с концентрацией 10^5 КОЕ/мл.

Минимальные микробоцидные и микробостатические ингибирующие концентрации (МИКц и МИКст соответственно) исследуемых веществ определяли

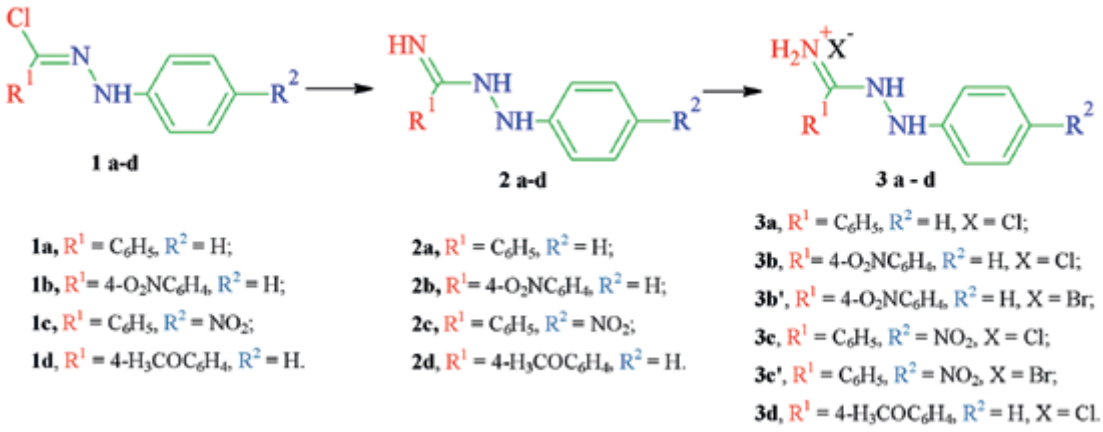


Рисунок 1. Схема синтеза производных амидразонов

методом их серийных разведений в питательных средах – мясопептонном бульоне (МПБ) или в жидкой среде Сабуро с последующим добавлением тест-культур, инкубированием и высевом на агаризованные питательные среды. Эксперименты выполняли в асептических условиях. Микробная нагрузка составляла 10^5 КОЕ/мл [9].

Растворы образцов гидрогалогенидов амидразонов **(3, a-d)** готовили в дистиллированной воде с исходной концентрацией 2 мг/мл.

Пробирки с бактериями культивировали при 37 °С, с грибами – при 24 °С в течение 24–48 ч. Результаты учитывали по наличию (помутнение среды) или отсутствию роста культур. Для выявления цидного или статического действия образцов производили высев на плотные питательные среды (МПА и среда Сабуро) в чашках Петри по секторам, инкубировали при оптимальных температурах и оценивали результаты по наличию или отсутствию роста культур [9].

In vivo были изучены острая токсичность, противовоспалительная и анальгезирующая активности полученных гидрогалогенидов амидразонов **(3, a-d)**.

Определение острой токсичности полученных соединений **(3, a-d)** проводили на белых нелинейных мышах-самцах (источник лабораторных животных: ФГУП «ПЛЖ «Рапполово») массой 20–25 г. Гидрохлориды *N*-арилбензкарбоксимидогидразидов **(3, a-d)** вводили однократно, внутрибрюшинно и перорально в интервале доз от 100 до 2000 мг/кг в виде водного раствора. Выживаемость животных определяли, наблюдая за ними в течение 48 ч от момента введения исследуемого соединения [9].

Противовоспалительную активность изучали двумя методами на скрининговой модели «формалиновый отек лапок» у мышей и модели асептического воспаления («ватная гранулема»).

Острую воспалительную реакцию (отек) осуществляли методом формалинового отека, воспроизводили сублантарным (подподошвенным) введением 0,1 мл 2% раствора формалина. Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3 ч после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически). Исследуемые вещества в дозе 50 мг/кг (1/40 LD_{50}) вводили зондом внутрижелудочно за 1 ч до введения формалина. Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению отека, выражали в процентах к контролю. По результатам действия не менее трех доз исследуемого вещества проводили расчет $ЭД_{50}$ [9].

Изучение противовоспалительной активности проводили методом «ватной гранулемы» (введение под кожу на спине крысы ватного шарика). Эксперимент проводили на крысах-самцах (источник лабораторных животных: ФГУП «ПЛЖ «Рапполово») массой 350–400 г. У крыс, находящихся под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг), в области спины выстригали шерсть. Ножницами делали разрез кожи длиной около 1 см, пинцетом в подкожной клетчатке через разрез формировали полость, куда помещали ватный шарик массой около 15 мг, затем на рану накладывали два шва. В течение семи дней экспериментальной группе перорально вводили раствор гидрогалогенидов амидразонов 5 мг/кг в 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия в сутки, группе сравнения – ЛП ацеклофенак по 12 мг/кг в 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия в сутки, контрольной группе – 0,9% раствор хлорида натрия. На восьмые сутки ватные шарики с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали, взвешивали и высушивали до постоянной массы при 60 °С. Пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой шарика. Экссудативную реакцию оценивали по разнице между массой сырой и высушенной гранулемы. Противовоспалительное действие (влияние на пролиферативный и экссудативный компоненты хронического воспаления) выражали в процентах по отношению к контролю [10].

Анальгезирующую активность изучали с помощью метода отдергивания хвоста от теплового излучения («tail-flick»). Метод основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на прогрессивно увеличивающееся воздействие теплового излучения на кожную поверхность. Исследования проводили на мышах массой от 20 до 25 г. Болевое раздражение наносили на хвост локально, воздействуя постепенно увеличивающимся тепловым излучением. Регистрировали латентный период реакции отдергивания хвоста. Величина латентного периода реакции составила от 2 до 4 с. Удлинение времени реакции интерпретируется как результат обезболивающего действия. Критерием анальгетического эффекта является достоверное увеличение латентного периода реакции после введения производных амидразонов в концентрации 20 мг/кг [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью специализированных программ установлено, что наиболее вероятными видами биологической активности гидрогалогенидов амидразонов **(3, a-d)** являются противовоспалительная, анальгезирующая, бактерицидная и фунгицидная [11].

На основании расчетов, проведенных с помощью программы PASS Targets, были выбраны следующие белки-мишени: *C. albicans* – глюкан 1,3-β-глюкозидаза, *St. aureus* – дегидросквален синтаза, *E. coli* – β-галактозидаза.

С помощью программы AutoDockVina мы произвели оценку энергии связывания между амидразонами **(2)** и белками-мишенями. При этом оказалось, что амидразоны **(2)** связываются с белком-мишенью эф-

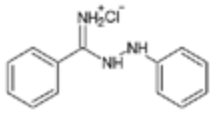
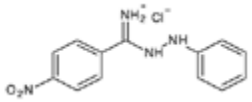
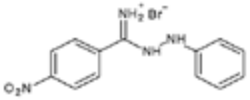
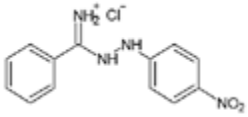
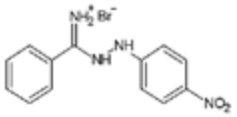
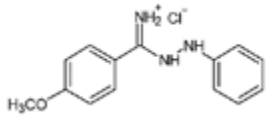
фективнее, чем уже известные антимикробные препараты [11]. Результаты компьютерного моделирования взаимодействия амидразонов с белками-мишенями позволили отобрать соединения для дальнейшего тестирования *in vitro*.

При экспериментальном исследовании антимикробного действия гидрогалогенидов амидразонов **(3, a-d)** на бактерии *E. coli* и *Bac. cereus* было установлено, что все исследуемые соединения оказались фактически неактивными в отношении данных культур.

Соединения **3c** и **3c'** обладали выраженным противостафилококковым действием, а соединения **3a** и **3b** – противокандидозным действием (таблица 1).

Таблица 1.

Биологическая активность гидрогалогенидов амидразонов (3, a-d)

Соединение	Тест-культуры	Концентрация (мкг/мл)	
		МИКст	МИКц
3a 	*St. aureus*	–	16
	C. albicans	8	16
	A. brasiliensis	–	125
3b 	*St. aureus*	–	16
	C. albicans	4	8
	A. brasiliensis	–	16
3b' 	*St. aureus*	–	16
	C. albicans	16	32,5
	A. brasiliensis	–	62,5
3c 	*St. aureus*	–	4
	C. albicans	–	250
3c' 	*St. aureus*	–	8
	C. albicans	–	250
3d 	*St. aureus*	–	62,5
	C. albicans	–	62,5
Флуконазол	*C. albicans*	–	32,5
Нифуроксазид	*St. aureus*	–	16
Вориконазол	*A. brasiliensis*	32.5	–

Уровень антимикробной активности амидразонов в отношении *St. aureus* зависел от характера вводимого в молекулу заместителя. Наибольшей антистафилококковой активностью обладали гидрохлорид **3c** и гидробромид **3c'**, содержащие нитрогруппу в *napa*-положении фенилгидразинового фрагмента. Соединения оказывали бактерицидное действие при МИКц 4 и 8 мкг/мл.

В качестве препарата сравнения был выбран активно используемый в клинической практике в Российской Федерации антибактериальный препарат нитрофуранового ряда «Нифуроксазид», также обладающий структурным сходством с амидразонами (капсулы 100 мг, № 7, 7 шт., упаковка контурная ячейковая, пачка картонная; ЛП-003940 2016-11-07; АО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское», Россия).

Минимальные ингибирующие концентрации соединений **3c** и **3c'** были в 2–4 раза ниже, чем у препарата сравнения.

Значительное влияние на противомикробную активность оказывал характер вводимого заместителя. При замене электроноакцепторного заместителя (нитрогруппы) электронодонорным (метоксигруппой) (соединение **3d**) бактерицидная активность значительно понижалась (МИКц 62,5 мкг/мл).

При изучении фунгицидной активности полученных соединений выраженным противогрибковым действием в отношении *C. albicans* обладали: соединение **3a** (МИКст 8 мкг/мл, МИКц 16 мкг/мл) и соединения с сильным электроноакцепторным заместителем (нитрогруппа) в *napa*-положении одного из арильных фрагментов – соединения **3b** (МИКст 4 мкг/мл, МИКц 8 мкг/мл) и **3b'** (МИКст 16 мкг/мл, МИКц 32,5 мкг/мл).

Фунгицидные концентрации соединений **3a** и **3b** при действии на *C. albicans* были ниже, чем у препарата сравнения флуконазола (МИКц 32 мкг/мл) (капсулы 100 мг, № 7, 7 шт., блистер, пачка картонная; ЛСР-007812/10 2016-12-01; АО «Фармацевтический завод «Тева», Израиль). Данные производные оказывали и фунгистатическое действие.

На основании результатов, полученных при изучении противогрибкового действия производных амидразонов **3**, были отобраны три наиболее активных соединения **3a, 3b** и **3b'**, для которых было проведено изучение их активности в отношении мицелиального гриба *A. brasiliensis*. При этом соединение **3b** оказывало фунгицидное действие при МИКц 16 мкг/мл, которая была в 2 раза ниже, чем у препарата сравнения вориконазола [таблетки, покрытые пленочной оболочкой 200 мг, № 30, 30 шт., флакон (флакончик) полиэтиленовый – пачка картонная; ЛП-003092 2015-07-14; АО «Фармацевтический завод «Тева», Израиль], который оказывал фунгистатическое действие при МИК ст 32,5 мкг/мл.

Острая токсичность LD_{50} полученных соединений составила при внутрибрюшинном введении от 100 до 500 мг/кг, при пероральном введении – от 1000 до

2000 мг/кг. Соединения при внутрибрюшинном и пероральном введении по классификации Ходжа и Стернера относятся к малотоксичным соединениям [10]. Результаты определения острой токсичности приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Острая токсичность гидрогалогенидов N-арилбензкарбоксимидогидразидов (3, a-d)

Соединение	LD_{50} (мг/кг)	
	При внутрибрюшинном введении	При пероральном введении
3a	300	1500
3b	400	2000
3b′	380	1900
3c	395	1850
3c′	390	1850
3d	200	1000

Противовоспалительную активность (двумя методами) и анальгезирующую активность *in vivo* проверяли у наиболее активного соединения было обнаружено, что гидрохлорида 4-нитро-N′-фенилбензолкарбок симидогидразида (**3b**).

При изучении противовоспалительной активности методом «ватной гранулемы» соединение **3b** обладало выраженным действием, чем препарат сравнения ацеклофенак (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг, № 10 – 10 шт., упаковка контурная ячейковая, пачка картонная; ЛП-002871 2015-11-05; ОАО «Синтез», Россия). Результаты исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Противовоспалительная активность по методу «ватная гранулёма»

Исследуемые растворы	Число животных	Экссудативная реакция	Пролиферативная реакция
Гидрохлорид 4-нитро-N′-фенилбензолкарбоксимидогидразид	6	0,086	0,079
Препарат сравнения ацеклофенак	6	0,092	0,069
Контроль – 0,9% хлорид натрия	6	0,14	0,14

Результаты исследования противовоспалительной активности методом «формалиновый отек лапок» приведены в таблице 4. Оценку отека проводили измерением объема стопы с помощью механического онкометра по А.С. Захаревскому [10].

Соединение **3b** проявляет более выраженное противовоспалительное действие, чем препарат сравнения ацеклофенак.

При исследовании анальгезирующей активности (таблица 5) в качестве препарата сравнения использовали метамизол натрия (анальгин).

Таблица 4.

Противовоспалительная активность по методу «формалиновый отек лапок»

Исследуемые растворы	Число животных	Выраженность экссудата	Антиэкссудативная активность в %
Гидрохлорид 4-нитро-N′-фенилбензолкарбоксимидогидразид	10	21,05	54
Препарат сравнения ацеклофенак	10	28,83	38
Контроль – 0,9% хлорид натрия	10	46,00	0

Таблица 5.

Анальгезирующая активность с помощью метода отдергивания хвоста от теплового излучения («tail-flick»)

Исследуемые растворы	Число животных	Флексорный рефлекс, с
Гидрохлорид 4-нитро-N′-фенилбензолкарбоксимидогидразид	10	5,08
Препарат сравнения – анальгин	10	5,61
Контроль – вода очищенная	10	2,41

В результате эксперимента было выявлено, что производное амидразона – соединение **3b** обладало более выраженным анальгетическим действием, чем препарат сравнения метамизол натрия (анальгин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 250 мг/мл, № 10, ампула 1 мл (5), упаковка контурная ячейковая (2), пачка картонная; P N001051/02-2016-08-22; «Дальхимфарм», Россия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что гидрогалогениды замещенных *N*′-арилбензолкарбоксимидогидразидов обладают противомикробным действием в отношении *St. aureus, C. Albicans* и *A. brasiliensis*.
2. Наиболее выраженное антистафилококковое действие оказывают два соединения – гидрохлорид и гидробромид *N*′-(4-нитрофенил)бензолкарбоксимидогидразида.
3. Гидрохлорид 4-нитро-*N*′-фенилбензолкарбоксимидогидразида оказывает эффективное противогрибковое действие в отношении дрожжей *C. albicans* и мицелиального гриба *A. brasiliensis*.
4. Показано, что противомикробная активность гидрогалогенидов замещенных *N*′-арилбензолкарбоксимидогидразидов зависит от электронной природы заместителей в арильных фрагментах амидразона. Наличие электроноакцептор-

ных заместителей в одном из бензольных колец повышает, а наличие электронодонорных заместителей снижает антимикробную активность соединений.

5. Определена полулетальная доза (LD_{50}). В опытах на мышах определили токсичность производных амидразонов. Соединения относятся к 4 классу токсичности (малотоксичные) по классификации Ходжа и Стернера.

6. Гидрохлорид 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида (**3b**) обладает выраженной противовоспалительной активностью, сравнимой с препаратом сравнения ацеклофенак.

7. Гидрохлорид 4-нитро-N'-фенилбензолкарбоксимидогидразида (**3b**) обладает выраженной анальгезирующей активностью, сравнимой с препаратом сравнения метамизол натрия (анальгин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения. URL: http://www.who.int/ru/ (дата обращения 20.11.2017).
2. Б.В. Пассет. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. – М.: Медицина, 1977.
3. D.G. Neilson. Chemistry Departament. – Scotland. 1969. P. 151–170.
4. PASS. URL: http://www.way2drug.com/PASSOnline/info.php (дата обращения 20.11.2017).
5. А.А. Евдокимов, А.С. Сенина, А.В. Москвин, И.А. Фридман, И.П. Яковлев, С.В. Гурина. Синтез, строение и биологическая активность некоторых амидразонов // Бутлеровские сообщения. 2014. Т. 39. № 8. С. 87–90.
6. D.A. Filimonov, V.V. Poroikov. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening / Ed. by A. Varnek and A. Tropsha. – Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008. P. 182–216.
7. ChEMBLdb // The European Bioinformatics Institute Part of the European Molecular Biology Laboratory [Official website]. URL: https://www.ebi.ac.uk/chembldb/ (дата обращения 04.03.2013).
8. П.В. Погодин, А.А. Лагунин, С.М. Иванов, В.И. Конова, Д.А. Филимонов, В.В. Поройков. Компьютерный прогноз взаимодействия низкомолекулярных органических соединений с белками-мишенями // Вестник РГМУ. 2013. № 4. С. 69–74.
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. – М. 2015. С. 848–923.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
11. A.S. Senina, A.A. Evdokimov, A.V. Moskvin, E.V. Fedorova. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Amidrazone Derivatives // Journal of Advanced Chemical Sciences. V. 2. Is. 1. 2016. P. 183–187.
12. H.U. Zeilhofer, D. Benke, G.E. Yevenes. Chronic pain states: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2012. V. 52. P. 111–133.



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 615.214.2; 616.831-005-092.4

МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРОВ

И.Н. Тюренков[1], Д.В. Куркин[1], А.А. Литвинов[1], Е.А. Логвинова[1], Е.И. Морковин[1], Д.А. Бакулин[1], Е.В. Волотова[1]*

Резюме. Успех разработки новых лекарственных препаратов в значительной степени зависит от методологии доклинических исследований. Для поиска средств с церебропротекторным действием существует множество экспериментальных моделей, различающихся в основном этиологическим фактором и сложностью воспроизведения. В данном обзоре описаны и охарактеризованы наиболее распространённые модели воспроизведения нарушений мозгового кровообращения, кратко представлены процедуры моделирования и опыт использования некоторых моделей в собственной исследовательской практике.

Ключевые слова: нарушение мозгового кровообращения, экспериментальные модели, окклюзия средней мозговой артерии, фототромбоз, эндотелин-1, крысы.

ACUTE STROKE MODELS USED IN PRECLINICAL RESEARCH

I.N. Tyurenkov[1], D.V. Kurkin[1], A.A. Litvinov[1], E.A. Logvinova[1], E.I. Morkovin[1], D.A. Bakulin[1], E.V. Volotova[1]*

Abstract. The success of developing new drugs largely depends on the methodology of preclinical research. For developing cerebroprotective drugs, there are many experimental models with different complexity. In this review the most used stroke models are described and characterized, model procedures briefly described, own research experience in utilizing some model methods in establishing efficacy of drugs is also described.

Keywords: stroke, experimental models, middle cerebral artery occlusion, photothrombosis, endothelin-1, rats.

1 – ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

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

* адресат для переписки:
E-mail: strannik986@mail.ru
Тел.: 8 (937) 533 49 99

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания имеют высокий удельный вес в структуре заболеваемости, временной нетрудоспособности, первичной инвалидизации и смертности. Вследствие этого остается по-прежнему актуальным поиск новых средств для лечения нарушений мозгового кровообращения (НМК) [1]. Успех поиска и разработки новых лекарственных препаратов для лечения любых заболеваний зависит от методологии доклинических исследований. Выбор методов моделирования НМК, объектов и валидных показателей, отражающих течение патологического процесса до и после проводимой терапии, является важнейшей задачей экспериментальной медицины.

Наиболее часто моделирование НМК проводится на грызунах, главным образом крысах, мышах и песчанках; меньше (по этическим и материальным причинам) используются кошки, собаки, свиньи и приматы. Подробные протоколы исследований и моделей, а также отзывы о преимуществах и недостатках их использования описаны достаточно подробно во многих работах [2–5]. Однако сравнительное, комплексное описание данных методов в рамках одной публикации встречается редко. Модели глобальной ишемии, приводящие к снижению кровообращения во всем объеме головного мозга, в первую очередь, воспроизводят церебральную ишемию, возникающую вследствие остановки сердца, выраженной гипотензии или реже хирургических процедур, нарушающих кровоток. Однако максимально близко клиническую ситуацию, связанную с развитием острого ишемического инсульта, воспроизводят модели фокальных поражений мозговой ткани, чаще обусловленные окклюзией просвета среднемозговой артерии (СМА). Окклюзия сосуда, как правило, достигается за счет использования мелких нитей, сгустка крови или протромботического

препарата [2, 3, 5]. Транзиторная окклюзия сосуда позволяет воспроизводить эффекты спонтанной реперфузии или успешного тромболизиса.

На сегодняшний момент нет идеальной модели инсульта. Основными причинами этого, на которые следует обратить внимание исследователей при моделировании НМК, являются гетерогенность данной патологии и наличие сопутствующих заболеваний. Гетерогенность инсульта отражает широкое разнообразие его клинических проявлений, которые зависят не только от причины, локализации, размера повреждения, функционального состояния субъекта. Большинство животных, включая грызунов, демонстрируют столь же высокую степень разнообразия строения мозговой сосудистой сети (строение виллизиева круга, средней мозговой артерии, коллатералей, образованных от слияния трех пар: задних, средних и передних мозговых артерий, и т.д.), как и человек [6], что при моделировании НМК создаёт определенные трудности для получения однородных качественных и количественных показателей. Даже инбредные штаммы грызунов, такие как мыши C57BL/6 [7, 8] и разные штаммы крыс или песчанок [6], характеризуются большой степенью неоднородности анатомии церебрального сосудистого русла, что при моделировании инсульта влияет на их чувствительность к инсульту, тяжесть его течения, исход, выраженность неврологических нарушений и действие фармакологических веществ [9].

Предварительное создание коморбидного фона у животного при воспроизведении фокальной ишемии приближает состояние к реальным условиям возникновения и течения острого НМК. Наличие гипертензии, гипергликемии и диабета всегда должно учитываться в случае моделирования специфических НМК, однако более глобальные последствия влияния метаболического синдрома и атеросклероза остаются неясными в отношении моделей НМК у животных [6]. Так, например, широко описано в литературе использование спонтанно гипертензивных крыс (СГК) в качестве модели с высоким риском возникновения инсульта [10, 11]. Их применение позволяет создать близкий к реальной клинической ситуации патофизиологический фон возникновения и течения инсульта, обусловленного артериальной гипертензией.

В данном обзоре описаны и охарактеризованы наиболее распространённые модели воспроизведения нарушений мозгового кровообращения, кратко описаны процедуры моделирования, представлен опыт использования некоторых моделей в собственной исследовательской практике для оценки эффективности разрабатываемых лекарственных средств.

МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Классификации моделей ОНМК и животных, используемых в качестве субъектов исследования на этих моделях, широко представлены в литературе [12–14]. Одна из последних представлена на рисунке 1.



Рисунок 1. Классификация моделей для создания НМК [15]

Выбор модели очень важен и существенно влияет на получаемые результаты, и, как уже говорилось выше, ни одна модель не может в полной мере воссоздать клиническую картину заболевания и процессы, происходящие при инсульте у человека, вследствие гетерогенности и индивидуальности патогенетических факторов, приводящих к ОНМК. Достаточно большое количество исследований по воспроизведению НМК, в частности окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА), было проведено на крупных животных: кошках [16–18] и приматах [19, 20], однако величины объема инфаркта варьировались в очень широких пределах, а стоимость разведения и содержания таких животных, их размеры (дозирование наркотических и лечебных веществ, условия содержания и т.п.) и гуманистические соображения в современных условиях не позволяют использовать их в большинстве экспериментальных исследований. Лабораторная крыса является наиболее подходящим объектом для моделирования НМК вследствие относительно невысокой стоимости, малого размера и хорошей изученности анатомического строения головного мозга, физиологии кровообращения и патофизиологии его нарушений.

В данном обзоре мы будем касаться моделей, выполняемых на крысах.

МОДЕЛЬ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ

В 1975 году Robinson и его коллеги [21] адаптировали методику прямой окклюзии проксимальной ветви средней мозговой артерии для крыс. В 1981 году группа исследователей под руководством A. Tamura [22] описала технику выполнения этой операции на крысах. Предложенная авторами модель достаточно сложна в исполнении, объем инфаркта мозга в результате был мал и не вызывал выраженной неврологической симптоматики, а возникающие симптомы психоневрологического дефицита исчезали в течение относительно короткого времени (5–8 суток) без фармакологического вмешательства. Более того, выполнение данной модели сопряжено с необходимостью обеспечения очень тщательного послеоперационного ухода и наблюдения за подопытными животными. В разные годы многими учеными предпринимались попытки увеличить объем инфаркта с помощью использования различных хирургических подходов или использования отдельных линий животных [23–26]. В настоящее время наибольшее распространение имеет техника прямой окклюзии центрального ствола среднемозговой артерии отдельно или в комбинации с постоянной / транзиторной односторонней / двусторонней окклюзией общих сонных артерий (ОСА) (в различных режимах) [27, 28]. В исследованиях А.А. Шмонина с соавторами [29] показано, что из всех модификаций моделей перевязки СМА и ОСА для фармакологического скрининга наиболее приемлема модель 40-минутного пережатия ОСА и окклюзии левой СМА, поскольку именно эта комбинация позволяла получить наиболее однородные показатели повреждения головного мозга [29]. Основным достоинством данной техники воспроизведения фокальной ишемии головного мозга, по нашему мнению, является визуализация процесса, обеспечивающая приемлемую стандартизацию (экспериментатор видит сосуд и его окклюзию) и оперативный контроль выполнения окклюзии артерии, что практически невозможно осуществить при иных методах ОСМА. При совершении ошибки экспериментатором методика позволяет своевременно исключить животное из экспериментальной группы, в то время как при иных методах моделирования решение об исключении животного принимается спустя несколько часов на основании отсутствия у него признаков неврологического дефицита. Самыми существенными недостатками, по нашему мнению, являются методические трудности при выполнении хирургических манипуляций и необходимость отработки модели на большом количестве животных, поскольку степень анатомической разветвленности средней мозговой артерии удаётся определить только при её визуализации, а решение о проведении окклюзии принимается экспериментатором только после обеспечения оперативного доступа к сосуду. Так, если в трепанационном отверстии не визуализируется центральная ветвь сосуда, а обнаруживается 1–2 или более сосудов, дальнейшие манипуляции с этим животным не имеют смысла, поскольку это указывает на то, что средняя мозговая артерия очень сильно ветвится. Даже при окклюзии этих ветвей, расположенных в пределах оперативного окна, патология не будет валидной, так как неврологический дефицит будет легкой степени, а через 3–5 дней все нарушения компенсируются без фармакологического вмешательства. В своих экспериментах, как и в литературных источниках, мы обнаружили, что средняя мозговая артерия у разных животных имеет не только неодинаковое количество ветвей и анастомозов, но и различный уровень начала их ветвления [30]. Также методика требует повышенного внимания к стерильности инструментария и операционного поля, а большое число потенциально травматичных манипуляций обязывает к тщательному послеоперационному уходу и наблюдению за животными.

Воспроизведение методики

После выполнения подготовительных процедур (описаны ниже) осуществляется вентральный срединный разрез в области шеи с последующим разделением тупым методом грудино-подъязычной и грудино-сосцевидной мышц. Выделяют правую и левую ОСА и

подводят под них лигатуру, в результате чего они изолируются от окружающих тканей.

Крысу переворачивают на левую сторону. Осуществляют надрез длиной около 2 см между боковым углом щели правого глаза и наружным слуховым проходом. Нижележащая височная мышца выделяется; под ней визуализируется височный нерв, артерия и вена. Далее височная мышца осторожно рассекается и убирается для доступа к черепу. Выделяется скуловая дуга, и большая ее часть удаляется. Верхнее крыло нижнечелюстной кости и мышцы отводятся для обеспечения доступа к нижневисочной ямке.

С помощью бормашины в чешуйчатой кости проделывается небольшое отверстие (диаметром от 4 до 6 мм на глубину от 0,5 до 1,0 мм при постоянном контроле ее твердости), которое находится примерно 3 мм спереди и 1 мм сбоку от овального отверстия и нижнечелюстного нерва, в непосредственной близости от дуги рострума. Кость черепа и трепанационное отверстие периодически орошаются стерильным физиологическим раствором.

Твердая мозговая оболочка вскрывается крестообразным или круговым надрезом иглы 23-го размера. СМА пролегает от нижней части черепа в поперечном направлении к теменной стороне. Артерия, как правило, имеет несколько ветвей, которые в значительной степени различаются у разных животных. Среднюю мозговую артерию пересекает нижняя церебральная вена. Изогнутыми пинцетами Dumont захватывают СМА и приподнимают на 1 мм до положения чуть выше или ниже нижней церебральной вены; затем под СМА подводят стерильную капроновую лигатуру или пережигают с помощью электрокоагуляции, что требует определенного навыка, поскольку существует риск возникновения кровотечения из-за прилипания части сосуда или кровяного сгустка к жалу коагулятора, что при его отведении ведёт к разрыву сосуда выше или ниже места прижигания.

Вследствие анатомической изменчивости СМА обычно имеет несколько различных ветвей, что диктует необходимость проводить окклюзию максимально широкого участка артерии с последующей визуализацией результата операции. Для ограничения вариабельности инфаркта при этой модели инсульта только один основной ствол артерии должен быть коагулирован. Если основной ствол СМА не может быть идентифицирован, то животное должно быть исключено из эксперимента.

После окклюзии рана орошается теплым стерильным физиологическим раствором, который быстро собирается ватным аппликатором.

Трепанационное отверстие герметизируется с помощью специальных средств Tissumend (Veterinary Products Laboratories) или Nexaband (Closure Medical Corporation). Топографию мышц восстанавливают и рану послойно ушивают стерильным шовным материалом.

Левую ОСА обратимо (через некоторое время в зависимости от конкретной методики, лигатура удаляется для последующей реперфузии) или необратимо окклюдируют, и после всех манипуляций рана ушивается стерильным шовным материалом.

Метод наркотизации и средства для наркоза и его доза, как правило, подбираются таким образом, чтобы его длительность не превышала 20 мин после завершения операции.

Далее осуществляется мониторинг неврологического и моторного дефицита. Крысы, которые не демонстрируют односторонний парез конечностей или другие симптомы неврологического дефицита, исключаются из дальнейшего исследования.

В случае применения модели временной окклюзии СМА, как правило с помощью микроклипс или временного наложения и стягивания лигатуры, ее используют совместно с временной (от 30 мин до 2 ч) окклюзией общих сонных артерий.

Описанные выше хирургические манипуляции обычно занимают от 20 до 25 мин.

МОДЕЛИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭНДОТЕЛИНА-1

Эндотелин-1 является соединением с выраженными вазоспастическими свойствами. Он оказывает быстрое и длительное вазоконстрикторное действие на гладкомышечные клетки сосудов и снижает локальный кровоток, вызывая ишемию тканей [31]. В основном используются две модели ишемии головного мозга с применением эндотелина-1, они различаются по способу его доставки к месту её локализации: местная аппликация эндотелином-1 выделенной СМА [21], внутримозговая инъекция по стереотаксическим координатам [32] или под оболочки головного мозга [33]. Аппликацию эндотелином-1 можно проводить в различных областях мозга для воспроизведения повреждения конкретных зон [34, 35].

Моделирование ишемии головного мозга с использованием эндотелина-1 удобно ввиду простоты выполнения методики. При этом размер инфаркта зависит от количества вводимого вазоконстриктора или площади и продолжительности аппликации. К недостаткам модели можно отнести высокую стоимость эндотелина-1 и необходимость точного ограничения зоны его нанесения, поскольку затекание раствора вазоконстриктора под оболочки мозга при аппликации или неконтролируемое его распространение при субдуральном введении делает размер ишемии труднопредсказуемым.

Воспроизведение методики

Выполнение этой модели заключается в том, что наркотизированному животному после подготовительных работ производится операционный доступ к поверхности черепа по методике Tamura [22], как описано выше, и далее по стереотаксическим координатам проделывается трепанационное отверстие диаметром 3–4 мм, через которое визуализируется ветвь средней мозговой артерии. После визуализации сосуда вокруг него накладывают силиконовый ограничитель (силиконовое кольцо, в просвете которого и будет находиться вазоконстриктор) и шприцем Гамильтона производят подачу раствора эндотелина-1 на поверхность сосуда. Наблюдают сильно выраженную вазоконстрикцию. Возможна количественная оценка степени сужения сосуда путем регистрации уровня локального мозгового кровотока лазерным доплерографическим флуометром в том же трепанационном окне. После проведения всех манипуляций рану обрабатывают антисептическими средствами и ушивают стерильным шовным материалом.

При внутримозговых инъекциях эндотелином-1 или при его субдуральном введении хирургические манипуляции аналогичны описанным выше, разница состоит лишь в размере трепанационного отверстия, в данном случае оно приблизительно соответствует диаметру иглы шприца Гамильтона [31]. В этом случае сосуды не визуализируются и исследователь полагается только на стереотаксические координаты или данные допплерографии, отражающие падение мозгового кровотока. Так, направляющую канюлю 26-го размера размещают в зоне грушевидной коры головного мозга на 1 мм дорсальнее СМА (на 0,2 мм впереди и 5,9 мм латеральнее брегмы, 7,0 мм ниже твердой мозговой оболочки) и закрепляют акрилатным цементом. В ее просвет вставляется канюля-вставка 31-го размера для поддержания проходимости просвета. Животное помещается как минимум на неделю в клетку. Для создания вазоконстрикции через канюлю 31-го размера, которая вводится на 1 мм глубже конца направляющей, вводят эндотелин-1 (120 пмоль растворяют в 3 мкл физиологического раствора). Через 10 мин фиксируют снижение кровотока. Описанные выше хирургические манипуляции, как правило, занимают от 3 до 5 мин.

МОДЕЛИ ИНСУЛЬТА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИНТРАЛЮМИНАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИЕЙ НИТИ

Модель внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) с помощью монофиламента широко используется для исследования острой фокальной ишемии головного мозга и его отека с момента первого её описания в 1986 году Koizumi [36], однако относительно высокая вариабельность размеров инсульта является существенным недостатком этой модели. Качество воспроизведения ишемии головного мозга этим методом зависит от корректности введения монофиламента через общую сонную артерию до внутренней сонной артерии, а затем до места ее вхождения в виллизиев круг и отхождения от него средней мозговой артерии. Модель требует отработанного навыка у исследователя, а также наличия специального монофиламента, размер и эластические свойства которого и будут определять простоту его продвижения в сосуде и степень его обтурации. Специально для этой модели были разработаны различные виды монофиламентов, в том числе и имеющие разные размеры от 3-0 до 4-0 [36], покрытые кремнием, поли-L-лизином и другими материалами или без покрытия, но с механически притупленным кончиком [37]. Наиболее часто используемым и оптимальным, по нашему мнению, является применение методики подготовки филамента путем притупления кончика нейлонового монофиламента 3-0, а затем его покрытия поли-L-лизином [38]. Поли-L-лизин способствует адгезии клеток и белков к стеклянной и пластиковой поверхностям. Это вещество образует монослой, который, как полагают, меняет отрицательный заряд поверхности филамента на положительный, что притягивает анионные участки эндотелиальных клеток и вызывает «прилипание» филамента к поверхности эндотелия, препятствуя потоку крови вокруг филамента.

Таким образом, в настоящее время существует две категории монофиламентов (без покрытия и с покрытием), используемые в этой модели ОСМА. Непокрытые монофиламенты включают те, которые притупляются нагревом; монофиламенты с покрытием включают обработанные поли-L-лизином, силиконовым полимером или каучуком.

Использование монофиламента без покрытия часто приводит к внутричерепным кровотечениям в результате перфорирования сосуда в полости черепа, что особенно часто происходит при сопутствующей эндотелиальной дисфункции, например, если методика воспроизводится на старых животных или животных с экспериментальным сахарным диабетом, и неполной окклюзии, так как отсутствие утолщения на конце филамента и процессов адгезии клеток на поверхности силикона делают возможным обтекание его кровью, что приводит к неполной окклюзии сосуда. Монофиламенты с поли-L-лизиновым покрытием улучшают окклюзию, но также повышают риск кровотечения из-за их клейких концов, которые могут разорвать люминальную поверхность артерий при изъятии филамента из сосуда для реперфузии. Подробное описание, а также способы подготовки филаментов описаны в литературе [12, 38].

Данная модель является вариантом НМК, обусловленным закрытием просвета мозгового сосуда тромбом или прогрессирующей атеросклеротической бляшкой. Она этиологически и патогенетически наи-

более близка к клиническому варианту развития цереброваскулярной недостаточности, а ее воспроизведение позволяет получить достаточно однородные размеры инсульта. Более того, модель предполагает различные варианты развития, различающиеся в основном техникой исполнения, временем окклюзии и полнотой реперфузии, что также является важным ее преимуществом [39, 40].

Недостатком данной модели является возможность неполной окклюзии СМА, для чего необходим контроль мозгового кровотока после внутрисосудистой окклюзии в проекции средней мозговой артерии. Помимо этого, возможно развитие кровотечения, требующее исключения животного, а также непредсказуемой и замаскированной трансформации ишемического повреждения в его геморрагическую форму вследствие перфорации сосуда монофиламентом или разрыва сосуда после реперфузии. После завершения эксперимента и эвтаназии при заборе головного мозга с целью определения размеров инсульта необходимо исключить из выборки тех животных, у которых обнаруживаются признаки геморрагии.

Воспроизведение методики

После подготовительных работ животному производят средний разрез в вентральной области шеи; грудино-подъязычную и грудино-сосцевидную мышцу рассекают для открытия правой ОСА, под которую временно подводят и затягивают лигатуру. Визуализируют наружную, а внутреннюю сонную артерию изолируют и освобождают от окружающих тканей в непосредственной близости от основания черепа. Затылочную артерию (ответвление внешней сонной артерии) коагулируют для предотвращения чрезмерного кровотечения. Под наружную сонную артерию подводят две лигатуры; ту, которая дальше от бифуркации, необратимо затягивают. Терминальный остаток длиной около 0,5 см от бифуркации наружной и внутренней артерий освобождают от окружающих тканей и разрезают на его дистальном конце. Этот сосудистый сегмент затем слегка отодвигают и удерживают в прямом направлении по отношению к внутренней сонной артерии.

Внутреннюю сонную артерию изолируют и аккуратно отделяют от блуждающего нерва. Дальнейшее препарирование выявляет языкоглоточный нерв, расположенный вблизи основания крыловидной артерии; эту экстракраниальную ветвь внутренней сонной артерии, направленную кзади, выделяют и под нее подводят лигатуру. На этом этапе она является единственным оставшимся ответвлением ОСА. Некоторые исследователи ее не выделяют, поскольку ввиду небольшого ее диаметра монофиламент в нее не проникнет, а на процесс реперфузии она никак не повлияет. Внутреннюю сонную артерию временно окклюдируют мелким сосудистым зажимом. Далее внешнюю сонную артерию перфорируют и через образовавшееся отверстие вводят монофиламент, который фиксируется второй лигатурой без тугого обжима. Микрососудистый зажим с внутренней сонной артерии удаляется, и монофиламент продвигается по сосуду на расстояние приблизительно 18–20 мм от бифуркации. На используемом монофиламенте должна быть отметка, дальше которой окклюдер не должен продвигаться (не более чем на 20 мм далее бифуркации), так как это может привести к перфорации сосудов виллизиева круга. Помимо расстояния, на которое вводится окклюдер, большое значение имеют такие признаки проникновения его в полость черепа, как чувство сопротивления, толчок филамента назад, наблюдение небольшого искривления окклюдера или растяжение артерии. Все это указывает на то, что окклюдер прошел основание среднемозговой и достиг проксимального участка переднемозговой артерии, имеющей меньший диаметр. В этот момент интралюминальный филамент блокирует основание СМА и кровоток по ней. После истечения необходимого времени (в зависимости от протокола исследования) окклюдер аккуратно, медленно удаляют из сосуда, наружную сонную артерию необратимо перевязывают оставшейся лигатурой ниже места перфорации. Затем от лигатуры освобождают ствол общей сонной артерии, после чего наступает полная реперфузия.

Перед тем как нить проталкивают во внутреннюю сонную артерию, зажим должен быть отпущен для допуска крови в сосуд. Это предотвращает спазм сосуда, который мешает успешному введению филамента. Если сосуд спазмирован, филамент должен быть убран назад в остаток внешней сонной артерии; после того как кровь прильет в сосуд, совершается повторная попытка.

Описанные выше хирургические манипуляции, как правило, занимают от 10 до 15 мин.

ЭМБОЛИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ИНСУЛЬТА

Воспроизведение этих моделей связано с введением эмболических материалов, создающих механическое препятствие току крови в ОСА или СМА, которые могут представлять собой кровяные тромбы (аутологичные или гетерологичные сгустки крови); полиэтиленовые, латексные или керамические микросферы диаметром до 50 мкм; поливинилсилоксан (ПВС); вязкое силиконовое масло или поливинилацетат. Тромботическая ишемия головного мозга может вызываться фотохимическим облучением ОСА или СМА после введения светочувствительного красителя, который при облучении лазерным лучом приобретает выраженный окислительный потенциал, локально повреждает эндотелий и клетки крови, в результате чего и развивается тромбоз.

МОДЕЛЬ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Данная экспериментальная модель инсульта позволяет приближенно к естественным условиям имитировать события, инициирующие окклюзию при инсульте у человека. Стоит отметить, что техника создания фототромбоза прогрессивно изменялась и совершенствовалась, так как были открыты вещества, которые демонстрируют мощные адгезивные свойства при облучении их светом или лазером с определенной длиной волны. Основным преимуществом этой модели является простота и необходимость проведения незначительных малотравматичных хирургических вмешательств в организм животного. Недостатками являются необходимость наличия сложного узкоспециализированного оборудования и расходных материалов, трудно контролируемый размер инсульта и развитие тяжелого системного оксидативного стресса, тяжесть развития которого спрогнозировать практически невозможно.

С помощью облучения аргоновым лазером с длиной волны 514,5 нм сонной артерии у крыс после инъекции бенгальского розового может быть вызвана последовательная степень стеноза в виде пристеночного, непрерывно эмболирующего тромба [41]. Аналогичная фотохимическая реакция, вызванная красителем эритрозином В, была использована позже для создания кольцевой модели инсульта, в развитии которой с помощью кольцеобразного лазерного луча (514,5 нм, аргон) инициируется конгруэнтный очаг ишемии, связанный с окклюзией мелких сосудов [42]. Кольцо поражения физически изолирует и постепенно приводит к ишемии всех тканей внутри этой метаболической зоны, таким образом моделируя процессы, происходящие в зоне развивающейся пенумбры, а инфаркт мозга при этом формируется относительно медленно. В описанных выше моделях инсульта зона пенубры меньше, некроз формируется намного быстрее. При этом если в первом случае повреждение тканей не останавливается, а, напротив, развивается, поскольку в очаге некроза и прилегающей к ней области сохраняется высокий окислительный потенциал, то во втором случае происходит обратный процесс, так как максимум повреждающего действия ишемии происходит в первые часы формирования зоны некроза и ишемической полутени. После прохождения этого периода наступает регресс ишемии за счет естественных защитных и компенсаторных механизмов. Таким образом, модели фотохимического тромбоза могут вызывать более тяжелые ишемические поражения, нежели те, которые основаны исключительно на хирургических техниках окклюзии мозговых сосудов.

НЕОКОРТИКАЛЬНЫЙ ИНСУЛЬТ

Этот, по сути, неинвазивный метод кортикального инсульта, воспроизводимый путем фототромботической окклюзии микрососудов, генерирует дискретную зону развивающегося инфаркта в любой заранее выбранной области неокортекса у крысы или мыши. Результаты гистологических, морфологических и реологических исследований, основанных на этой модели кортикальной микрососудистой окклюзии, со времени первоначального исследования были описаны в сотнях публикаций различных лабораторий [43–45]. Хотя этот метод вызывает тромботический инсульт, он не имеет прямой клинической аналогии, так как наблюдается окклюзия главным образом в небольших корковых сосудах (менее чем 40 мкм), а не в крупной артерии или ее ответвлении.

Воспроизведение методики

После первоначальной дооперационной подготовки голова животного иммобилизуется в металлическом корпусе со стереотаксическими координатами. Поверхность черепа скальпируется, и определяются координаты для лазерного облучения, которые ограничиваются непрозрачным материалом. Они прикрепляются к черепу временным цементом, в образовавшееся между пластинами окно для создания равномерной оптической плотности наносится минеральное масло. Таким образом, зона и степень воздействия лазерного луча становится сопоставимой у всех животных в группе. Трепанации черепа в этой модели не требуется, однако предпочтительно использовать молодых животных возрастом от 5 до 7 месяцев.

Далее аликвоту 10 (12,5) мг/мл раствора бенгальского розового (эритрозина Б) инфузируют с интервалом 1,5 (1,0) мин в дозе 1 мл/кг массы крысы через бедренную, хвостовую (предпочтительнее) или яремную вену. После 30 с инфузии эритрозина Б можно начинать облучение лазером при интенсивности 200 мВт см^2. В настоящее время наиболее эффективные, хотя и дорогие, лазеры работают при длине волны 532 нм или имеют настраиваемую мощность. Всего лишь 3 минут облучения достаточно для получения полного коркового поражения. Преимуществом использования лазера с длиной волны, близкой к максимуму поглощения красителя, является то, что при рекомендованной интенсивности никакое внешнее охлаждение облучаемой поверхности черепа не требуется. В отличие от этого облучение даже оптически отфильтрованной дуговой лампой требует охлаждения.

Альтернативной описанному выше способу является кольцевая модель, в которой вместо сплошного используется кольцеобразный лазерный луч, который фотохимически создает кольцевое корко-

вое поражение внутри его пространства. Как предполагается, именно таким образом происходит развитие пенумбры. Кольцевой луч получается путём введения 514,5 нм аргонового лазерного луча в оптическое волокно, расположенное кольцом на черепе крысы [42]. Развивающийся вазогенный отек, радиально распространяющийся от ишемического очага, очевидно, и является ведущей причиной развития поражения, так как окислительный потенциал эритрозина Б, облученного лазером, расходуется достаточно быстро и зона, в которой развивается оксидативный стресс, относительно небольшая. Именно в этом и есть основное различие описанных выше двух подходов к моделированию неокортикального инсульта.

ФОТОТРОМБОЗ СМА, ВЫЗВАННЫЙ ФОТОХИМИЧЕСКИ ИНТРАВАСКУЛЯРНО *IN SITU*

После проведения подготовки животных и стандартных хирургических манипуляций по методике, описанной выше, осуществляется доступ к ветви средней мозговой артерии. Далее вызывается фототромботическая окклюзия дистальной СМА лазером MicroGreen или Laserglow LCS-532 мощностью 15 мВт в сочетании с эритрозином В или бенгальским розовым, вводимым системно в дозе 25 или 20 мг/кг соответственно за 15 мин до начала облучения. Окклюзия наступает в среднем через 2 мин после начала облучения.

Альтернативно окклюзию СМА можно вызвать при помощи специальной смеси, чувствительной к активатору фактора плазминогена тромба при проведении фоточувствительной реакции [46].

ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОЕ СУЖЕНИЕ ВНУТРЕННЕГО ПРОСВЕТА ОБЩЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ

Сужение просвета общей сонной артерии, возникающее от фототромботического тромбоцитарного стеноза, было первоначально разработано посредством облучения аргоновым лазером с длиной волны 514,5 нм при средней интенсивности 55 Вт/см^2 общей сонной артерии крыс после инъекции бенгальского розового в дозе 40 мг/кг. Вскоре был найден способ усилить возникающий стеноз (до 50–70%) путем облучения тканей лазерным излучением с параметрами 22 Вт/см^2, 562 нм на пике поглощения бенгальского розового. Впоследствии использовалось облучение аргоном при длине волны 514,5 нм и интенсивности 50 Вт/см^2 в сочетании с эритрозином В в дозе 37 мг/кг. Эта модель вызывает значимый гемодинамический дефицит и микрофокальную ишемию.

Воспроизведение методики заключается в осуществлении оперативного доступа к общей сонной артерии и установке на нее датчика регистрации скорости кровотока и лазерного луча.

Во всех методиках, основанных на фототромботической реакции, настройка и фокусировка лазерного луча на сосуд животного производится только до введения фоточувствительного агента.

Разные виды животных имеют разную чувствительность к фототромботической реакции. Так, в исследованиях B.D. Watson [46] было показано, что для окклюзии общей сонной артерии мыши диаметром 400 мкм требуется аргоновый лазер мощностью 165 мВт с длиной волны 514 нм со сфокусированной интенсивностью около 130 Вт/см^2, что сопоставимо с интенсивностью, необходимой для окклюзии общей сонной артерии крыс. Было также установлено, что морские свинки гораздо более чувствительны к фототромбозу, чем крысы и мыши, и требуют только 50 мВт аргонового 514 нм облучения для окклюзии 2 мм общей сонной артерии при интенсивности 1,7 Вт/см^2 в течение 1 мин.

ОБЩИЕ МАНИПУЛЯЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОПЕРАЦИЙ ПО МОДЕЛИРОВАНИЮ ОСТРЫХ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

Отбор животных

Экспериментальных животных необходимо отбирать таким образом, чтобы их возраст и масса тела были максимально однородны, взвешивать животных необходимо непосредственно перед каждой операцией. Следует учитывать, что чем старше крыса, тем более плотная у неё сеть кровеносных сосудов и толще кости черепа.

Хирургический инструмент

Для проведения хирургических манипуляций на мелких лабораторных животных удобно использовать инструментарий и шовный материал для проведения офтальмологических операций у человека. Шовный материал должен быть нерассасывающимся.

Анестезия

Для проведения ингаляционного наркоза животных помещают в камеру для анестезии, наиболее часто используемая газовая смесь для введения животных в наркоз представляет собой 3–4% изофлуран в смеси 30% кислорода (O_2) и 70% закиси азота (N_2O).

Для неингаляционной системной анестезии чаще используют внутрибрюшинные, реже внутримы-

шечные, внутривенные (редко) и подкожные (редко) инъекции этаминала натрия (от 30 до 40 мг/кг, в/б), хлоралгидрата (от 300 до 450 мг/кг, в/б), кетамина (80 мг/кг, в/б) в комбинации с ксилазилом (10 мг/кг, в/б), а также золетила (10 мг/кг, в/б) в комбинации с ксилазилом (5 мг/кг, в/б). Для местной анестезии с целью предотвращения развития синокаротидного рефлекса и профилактики состояния острой боли в послеоперационном периоде используют растворы анестетиков (лидокаин 2%, новокаин 0,5%, бупивакаин 0,5%), которые наносят непосредственно на нервные волокна и/или на операционное поле в небольшом количестве (от 100 до 200 мкл) [47, 48].

При изучении соединений с церебропротективной активностью особое внимание следует уделить выбору средств, способа и длительности наркоза, поскольку у большинства веществ, используемых для общей анестезии, имеется отчетливое церебропротективное действие. Предпочтение следует отдавать управляемому наркозу, т.е. когда экспериментатор может экстренно вывести животное из наркоза.

Обработка операционного поля

При необходимости удаления шерстяного покрова (с головы, шеи, спины и т.д.) допускается его сбривание или, что более предпочтительно, использование депиляционного крема. Обработка операционного поля (до и после операции) и окружающей его области осуществляется растворами спирта (70%), хлоргексидина (0,05%), бетадина (0,5%) или йода (2%). Изоляция оперативного поля достигается использованием сетчатых (трубчатых) бинтов (животное помещается в бинт, а на месте операционного поля он разрезается).

Для защиты раны от инфекции распыляют аэрозоль фуразолидона, допускается применение антибактериальных средств в виде порошков или растворов, которые наносятся на рану и на послеоперационный шов. В наших исследованиях для профилактики инфицирования ран мы используем глазную мазь с тетрациклином или левомицетином, порошок банеоцин, растворы хлоргексидина, фурацилина, бриллиантового зеленого, йода.

Защита глаз животного

Для предотвращения сухости глаз животного во время проведения операции на них помещают глазной гель. Веки животного во время операции должны быть плотно закрыты для предотвращения повреждения зрения из-за яркого света.

Мониторинг жизненно важных параметров

В большинстве исследований по моделированию ишемии головного мозга необходимо осуществлять мониторинг системных параметров животного, таких как АД, ЧСС, глубина и частота дыхательных актов, температура тела.

При проведении экспериментов не допускается возникновение кровотечений объемом более 200 мкл. Животные с подобными кровотечениями должны быть исключены из дальнейших исследований.

Оценка качества воспроизведения модели (первичная)

Количественная оценка скорости мозгового кровотока на всех этапах воспроизведения модели его нарушения всегда предпочтительна, а в некоторых случаях (модель с внутрисосудистой окклюзии СМА) просто необходима. Наиболее подходящими для этих целей являются методы лазерной или ультразвуковой доплеровской флоуметрии.

Интубация

Для повышения оксигенации животных возможно проведение интубации с помощью эндотрахеальной трубки (силиконовая трубка длиной 3–4 см и диаметром 1–1,2 мм). В качестве направляющей используется модифицированная тупая спинальная игла. Во время отработки навыка целесообразно надрезать область шеи для визуализации трахеи, чтобы убедиться, что эндотрахеальная трубка вставлена правильно. Быстрая оценка проводится путем помещения инструмента из нержавеющей стали в переднюю часть трубки так, чтобы можно было наблюдать конденсацию дыхательной влаги. Если конденсации влаги не наблюдается, то это означает, что трубка находится не в трахее. Эндотрахеальная трубка закрепляется на морде животного с помощью временного шва.

Возможно применение интраназальной интубации (необходима принудительная подача газовой смеси).

Реперфузия

Известно, что реперфузия по своему повреждающему действию не только не уступает ишемии, но в некоторых случаях превосходит ее. У каждого конкретного животного и ишемия, и последующая реперфузия могут происходить по-разному и с различной повреждающей составляющей. Поэтому процесс реперфузии должен быть по возможности управляемым или мониторируемым с целью своевременного исключения животного из эксперимента.

Аналогично важности моделирования тромботического/эмболического инсульта необходима разработка надежных способов удаления церебральных артериальных окклюзий с минимальными побочными эффектами. Поскольку вне зависимости от природы окклюдера (силикон, сгусток крови, продукты фототромботической реакции и т.д.) почти каждый

метод реканализации будет вызывать возникновение (или индуцировать образование) фрагментов тромбов разных размеров. Их возникновение может поразному влиять на экспериментальных животных в послеоперационном периоде и искажать терапевтический ответ на проводимую церебропротективную терапию. Так, если фокальная ишемия головного мозга воспроизводится у животных с повышенным коагулопатическим потенциалом (например, при сахарном диабете) методом внутрисосудистой окклюзии с последующей реперфузией, количественную оценку мозгового кровотока необходимо давать не только на момент введения монофиламента, но и при реперфузии. То есть контролироваться должна не только окклюзия, но и реперфузия, а точнее, ее наличие. Такая необходимость связана с тем, что монофиламент, находясь в сосуде головного мозга, мог инициировать образование тромба, который будет препятствовать реперфузии и способствовать существенному увеличению объема некроза, не связанного с действием фармакологически активных веществ.

Использование лазерного луча в моделях с фотохимической реакцией

Луч сначала устанавливается на очень малой мощности через расстояние в 25 см на сферической стеклянной линзе с антибликовым покрытием, а затем отражается на выбранном сегменте дистальной СМА. Затем мощность пучка P рассчитывают, чтобы обеспечить интенсивность I около 13 Вт/см^2, по формуле:

$$I\ (W/cm^2) = 12{,}73\ P\ (мВт) / D\ (1(100\ \mu m)^2,$$

где D кратно 100 мкм (обычно от 1,8 до 2,4 для типичной дистальной СМА диаметром от 180 до 240 мкм). Для сегмента диаметром 200 мкм (D=2) P=4 мВт.

По мере того как мощность лазера увеличивается до желаемого уровня, интенсивная соломенно-желтая (оранжевая) флуоресценция в связи с возбуждением циркулирующего эритрозина B (бенгальского розового) остается видимой. Затем флуоресценция исчезает и образовавшийся тромб окрашивается лазерным лучом.

Послеоперационный уход

После выхода животных из наркоза для профилактики обезвоживания допускается внутрижелудочное введение до 5 мл воды. В послеоперационном периоде желательно содержать животных в просторных (540x390x210 мм) клетках либо изолированно, либо малыми группами (по 3–4 особи) и переводить их на облегченный режим питания (размоченный комбинированный корм).

Достоинства и недостатки моделей создания ОНМК в экспериментальных исследованиях на крысах представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Достоинства и недостатки моделей используемых для моделирования нарушений мозгового кровообращения [49]

Модель	Достоинства	Недостатки
Интралюминальные модели ОСМА	Имитирует инсульт у человека. Формирует пенумбру. Высокая воспроизводимость. Возможность осуществления контролируемой реперфузии. Отсутствие краниотомии.	Повышение риска кровотечений при использовании некоторых типов окклюдеров. Не подходит для изучения тромболитических препаратов.
Модели с краниотомией	Длительная и стойкая выживаемость животных. Визуальный контроль эффективной окклюзии.	Высокая инвазивность и риск осложнений. Требует высокого уровня хирургического мастерства.
Фототромботические модели	Позволяет осуществить локализованное ишемическое повреждение. Высокая воспроизводимость. Малая инвазивность.	Вызывает ранний сосудистый отек, отсутствующий в клинической ситуации. Не подходит для изучения нейропротекторных свойств соединений.
Модели с применением эндотелина-1	Малая инвазивность. Воспроизведение ишемического повреждения в корковых или подкорковых зонах мозга. Низкая летальность.	Неконтролируемая длительность ишемии. Вызывает астроцитолиз и аксональное прорастание, что может повлиять на интерпретацию результатов. Низкая воспроизводимость инфарктов мозга.
Эмболические модели	Наиболее близка к клиническому течению инсульта у человека. Подходит для изучения тромболитических препаратов.	Возможна спонтанная реканализация. Высокая вариабельность размеров повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная медицина нуждается в создании оригинальных лекарственных средств, поскольку мировая статистика демонстрирует снижение эффективности лечения многих социально значимых заболеваний. Ученые связывают это обстоятельство с тем, что возможностей существующих лекарственных средств, их комбинаций и терапевтических стратегий недостаточно для сохранения темпов увеличения продолжительности и качества жизни людей.

Несмотря на широкое использование в настоящее время мишень-ориентированного скрининга, основанного на использовании протеомных, клеточных и других технологий, создание лекарственных средств невозможно без проведения исследований *in vivo*, а моделирование в этих условиях патологического процесса является единственным эффективным методом оценки эффективности разрабатываемого препарата. На выбор метода моделирования влияет множество факторов, в числе которых профиль лаборатории, ее материально-технические и финансовые возможности, квалификация и число сотрудников. В то же время выбранная экспериментальная модель должна отвечать обязательным требованиям: в максимальной степени соответствовать патологическим процессам, происходящим у человека, быть воспроизводимой, поддаваться фармакологической коррекции.

В данном обзоре была предпринята попытка кратко описать экспериментальные модели, используемые для скрининга и оценки эффективности соединений с церебропротективной активностью, приведены их основные достоинства и недостатки, а также техники исполнения. В заключительной части даны общие рекомендации относительно выполнения манипуляций с животными при проведении хирургических операций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.И. Гусев, А.С. Чуканова. Современные патогенетические аспекты формирования хронической ишемии мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 3–1. С. 4–8.
2. S.T. Carmichael. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose // NeuroRx. 2005. V. 2. № 3. P. 396–409.
3. U. Dirnagl, M.R. Macleod. Stroke research at a road block: the streets from adversity should be paved with meta-analysis and good laboratory practice // Br. J. Pharmacol. 2009. V. 157. № 7. P. 1154–1156.
4. S. Braeuninger, C. Kleinschnitz, B. Nieswandt, G. Stoll. Focal cerebral ischemia methods // Mol. Biol. 2012. V. 788. P. 29–42
5. E.G. Sozmen, J.D. Hinman, S.T. Carmichael. Models that matter: white matter stroke models // Neurotherapeutics. 2012. V. 9. № 2. P. 349–358.
6. D.W. Howells, M.J. Porritt, S.S. Rewell, V. O'Collins, E.S. Sena, H.B. van der Worp, R.J. Traystman, M.R. Macleod. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2010. V. 30. № 8. P. 1412–1431.
7. N. Beckmann. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo // Magn Reson Med. 2000. V. 44. № 2. P. 252–258.
8. B.W. McColl, H.V. Carswell, J. McCulloch, K. Horsburgh. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice // Brain Res. 2004. V. 997. № 1. P. 15–23.
9. F.C. Barone, D.J. Knudsen, A.H. Nelson, G.Z. Feuerstein, R.N. Willette. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1993. V. 13. № 4. P. 683–692.
10. Y. Yamori. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension // Clin. Sci. Mol. Med. Suppl. 1976. V. 3. P. 431–434.
11. E.L. Bailey, C. Smith, C.L. Sudlow, J.M. Wardlaw. Is the spontaneously hypertensive stroke prone rat a pertinent model of sub cortical ischemic stroke? A systematic review // Int. J. Stroke. 2011. V. 6. № 5. P. 434–444.
12. Manual of stroke models in rats / Ed. by Yanlin Wang Fischer. – Taylor & Francis Group: CRC Press, 2008. 340 p.
13. S.J. Murphy, L.D. McCullough, J.M. Smith. Stroke in the female: Role of biological sex and estrogen // ILAR J. 2004. V. 45. № 2. P. 147–153.
14. S.M. Graham, L.D. McCullough, S.J. Murphy. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care // Comp. Med. 2004. V. 54. № 5. P. 486–497.
15. K.A. Radermacher, K. Wingler, F. Langhauser, S. Altenhöfer, P. Kleikers, J.J. Hermans, M. Hrabě de Angelis, C. Kleinschnitz, H.H. Schmidt. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress // Antioxid. Redox. Signal. 2013. V. 18. № 12. P. 1418–1427.
16. K.A. Hossmann, F.J. Schuier. Experimental brain infarcts in cats. Pathophysiological observations // Stroke. 1989. V. 11. № 6. P. 583–592.
17. B. Bose, J.L. Osterholm, R. Berry. A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the cat // Brain Res. 1984. V. 311. № 2. P. 385–391.
18. W. Paschen, M. Sato, G. Pawlik, C. Umbach, W.D. Heiss. Neurologic deficit, blood flow and biochemical sequelae of reversible focal cerebral ischemia in cats // J. Neurol Sci. 1985. V. 68. № 2–3. P. 119–134.
19. T.H. Jones, R.B. Morawetz, R.M. Crowell, F.W. Marcoux, S.J. FitzGibbon, U. DeGirolami, R.G. Ojemann. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys // J. Neurosurg. 1981. V. 54. № 6. P. 773–782.
20. S. Hayashi, D.G. Nehls, C.F. Kieck, J. Vielma, U. DeGirolami, R.M. Crowell. Beneficial effects of induced hypertension on experimental stroke in awake monkeys // J. Neurosurg. 1984. V. 60. № 1. P. 151–157.
21. M.J. Robinson, I.M. Macrae, M. Todd, J.L. Reid, J. McCulloch. Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the

rat // Neurosci. Lett. 1990. V. 118. № 2. P. 269–272.

22. A. Tamura, D.I. Graham, J. McCutloch, G.M. Teasdale. Focal cerebral ischaemia in the rat: description of the technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1981. V. 1. P. 53–60.

23. P. Coyle. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat // Anat. Rec. 1984. V. 210. № 2. P. 357–364.

24. P. Coyle. Outcomes to middle cerebral artery occlusion in hypertensive and normotensive rats // Hypertension. 1984. V. 6. № 2. P. 69–74.

25. J.B. Bederson, L.H. Pitts, M. Tsuji, M.C. Nishimura, R.L. Davis, H. Bartkowski. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination // Stroke. 1986. V. 17. № 3. P. 472–476.

26. S.T. Chen, C.Y. Hsu, E.L. Hogan, H. Maricq, J.D. Balentine. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction // Stroke. 1986. V. 17. № 4. P. 738–743.

27. А.В. Топчян, Р.С. Мирзоян, М.Г. Баласанян. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1996. Т. 59. № 5. С. 62–64.

28. И.Н. Тюренков, Е.В. Волотова, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, И.О. Логвинов, Т.А. Антипова. Нейропротекторное действие нейроглутама в условиях активации свободно-радикального окисления // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 8. С. 16–19.

29. А.А. Шмонин. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2011. Т. 10. № 3. С. 68–76.

30. D. Chalothorn, J.E. Faber. Formation and vaturation of the native cerebral collateral circulation // J. Mol. Cell Cardiol. 2010. V. 49. № 2. P. 251–259.

31. J. Sharkey, I.M. Ritchie, P.A. Kelly. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat // J. Cereb. Blood Flow Metab. 1993. V. 13. № 5. P. 865–871.

32. P.M. Hughes, D.C. Anthony, M. Ruddin. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1 // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2003. V. 62. № 12. P. 1276–1286.

33. K. Fuxe, B. Bjelke, B. Andbjer, H. Grahn, R. Rimondini, L.F. Agnati. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia // Neuroreport. 1997. V. 8. № 11. P. 2623–2629.

34. S.B. Frost, S. Barbay, M.L. Mumert, A.M. Stowe, R.J. Nudo. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat // Behav. Brain Res. 2006. V. 169. № 2. P. 206–211.

35. N.M. Ward, J. Sharkey, H.M. Marston, V.J. Brown. Simple and choice reaction-time performance following occlusion of the anterior cerebral arteries in the rat // Exp. Brain Res. 1998. V. 123. № 3. P. 269–281.

36. J. Koizumi, Y. Yoshida, T. Nakazawa, G. Ooneda. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area // Jpn. J. Stroke. 1986. V. 8. P. 1–8.

37. E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // Stroke. 1989. V. 20. P. 84–91.

38. L. Belayev, O.F. Alonso, R. Busto, W. Zhao, M.D. Ginsberg. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture neurological and pathological evaluation of an improved model // Stroke. 1996. V. 27. № 9. P. 1616–1622.

39. И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т. 77. № 9. С. 8–12.

40. А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, Н.А. Гурова, Н.И. Чепляева, Е.В. Резников. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2014. № 4. С. 39–45.

41. N. Futrell N. C. Millikan, B.D. Watson, W.D. Dietrich, M.D. Ginsberg. Embolic stroke from a carotid arterial source in the rat: pathology and clinical implications // Neurology. 1989. V. 39. № 8. P. 1050–1056.

42. P. Wester, B.D. Watson, R. Prado, W.D. Dietrich. A photothrombotic «ring» model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion // Stroke. 1995. V. 26. P. 444–456.

43. H. Yanamoto, I. Nagata, Y. Niitsu, J.H. Xue, Z. Zhang, H. Kikuchi. Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique // Exp. Neurol. 2003. V. 182. № 2. P. 261–274.

44. A.M. Buchan, D. Xue, A. Slivka. A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat // Stroke. 1992. V. 23. № 2. P. 273–279.

45. K. Hiramatsu, N.F. Kassell, Y. Goto, S. Soleau, K.S. Lee. A reproducible model of reversible, focal, neocortical ischemia in Sprague-Dawley rat // Acta Neurochir. (Wien). 1993. V. 120. № 1–2. P. 66–71.

46. B.D. Watson. Concepts and techniques of experimental stroke induced by cerebrovascular photothrombosis. Central Nervous System Trauma. – Florida: CRC Press, 1995. 438 p.

47. J.L. Tremoleda, A. Kerton, W. Gsell. Anaesthesia and physiological monitoring during in vivo imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare // EJNMMI Res. 2012. V. 2. № 1. P. 44.

48. J.A. Davis. Mouse and rat anesthesia and analgesia // Curr. Protoc. Neurosci. 2008. Appendix 4:Appendix 4B.

49. F. Fluri, M.K. Schuhmann, C. Kleinschnitz. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research // Drug Des. Devel. Ther. 2015. V. 2. № 9. P. 3445–3354.

УДК 616-07; 614.253.8

МОТИВАЦИЯ И ОПЫТ УЧАСТИЯ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ В РОССИИ

И.В. Мареев[1]*, И.А. Самыкина[1], М.Ю. Колокольцова[1], И.Д. Пименов[2], М.С. Тимофеев[1], Е.С. Куликов[2], И.А. Деев[2], Е.В. Бородулина[1], О.С. Кобякова[2], В.В. Удут[1]

Резюме. Определение безопасности, переносимости и эффективности лекарственных средств во многом связано с результатами клинических исследований (КИ). На сегодняшний день исследования I фазы, фармакокинетики и биоэквивалентности, проводимые с участием здоровых добровольцев, являются одним из основных путей регистрации лекарственных препаратов в нашей стране и мире. Несмотря на это, на данный момент остается открытым вопрос восприятия субъектами данных видов исследований. Целью работы явился анализ формирования и приоритетов мотивационной детерминанты в результате оценки опыта участия здоровых добровольцев в КИ. В ходе выполнения исследования проведена оценка факторов, влияющих на принятие решения об участии в исследованиях биоэквивалентности.

Ключевые слова: клинические исследования, биоэквивалентность, восприятие, мотивация.

MOTIVATION AND PARTICIPATION EXPERIENCE OF HEALTHY VOLUNTEERS IN THE CLINICAL TRIALS OF BIOEQUIVALENCE IN RUSSIA

I.V. Mareev[1]*, I.A. Samykina[1], M.Y. Kolokoltsova[1], I.D. Pimenov[2], M.S. Tomofeev[1], E.S. Kulikov[2], I.A. Deev[2], E.V. Borodulina[1], O.S. Kobyakova[2], V.V. Udut[1]

Abstract. The definition of safety, tolerability and efficacy of drugs is largely related with the results of clinical trials (CTs). Currently, phase I studies, pharmacokinetics and bioequivalence, conducted with the participation of healthy volunteers, are one of the main ways to registering drugs in our country and in the world. Despite this, the question of perception by the subjects of these types of studies remains open to this day. The purpose of this work was to analyze the formation and priorities of the motivational determinant by evaluating the experience of participation of healthy volunteers in CTs. During the study, the factors influencing the decision to participate in bioequivalence studies were analyzed.

Keywords: clinical trials, bioequivalence, perception, motivation.

1 – Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3.

2 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

1 – Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, 3, Lenina av., Tomsk, 634028, Russia

2 – Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: igor.mareev@pharmso.ru
Тел.: +7 (923) 401 53 63

ВВЕДЕНИЕ

Оценка биоэквивалентности является видом клинических исследований и медико-биологического контроля воспроизведенных (генерических) лекарственных средств, которые позволяют сделать обоснованные заключения о качестве сравниваемых препаратов, предположить, что они обеспечивают одинаковую эффективность и безопасность фармакотерапии, и, как следствие, успешно пройти процедуру регистрации.

За последние несколько лет количество выданных регуляторными органами разрешений на проведение исследований биоэквивалентности с каждым годом увеличивается. Так, по данным Ассоциации организаций по клиническим исследованиям (АОКИ), в 2014 году регулятор одобрил 243, в 2015 уже 296 подобного типа исследований, а за последний, 2016, год было разрешено проведение 316 исследований биоэквивалентности в нашей стране [1–3].

Проведение исследований воспроизведенных лекарственных препаратов в Российской Федерации регламентируется рядом законодательных актов и рекомендаций, и, несмотря на ряд общих отличий от регулирующих данную

область документов Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) и European Medicines Agency (Европейское агентство лекарственных средств), общепринятым правилом является привлечение в качестве субъектов здоровых добровольцев [4, 5]. Согласно данным АОКИ, в 2016 году только в России в качестве участников клинических исследований различных фаз, в том числе и биоэквивалентности, было привлечено более 10000 здоровых добровольцев [3].

Формирование когорт добровольцев является одним из ответственных аспектов организации клинических исследований, от которого зачастую зависит результат. С одной стороны, как показали зарубежные и единичные отечественные исследования, задача привлечения добровольцев осложняется низким уровнем информированности, а также настороженным или отрицательным отношением подавляющего большинства населения ко всему, что связано с участием в клинических испытаниях [6, 7].С другой стороны, в исследованиях биоэквивалентности, как правило, предусмотрено вознаграждение или компенсация затрат для его участников и, на первый взгляд, очевидным является тот факт, что размер выплат зачастую становится определяющим стимулом, а медико-социальные и этические аспекты при этом уходят на второй план, несомненно оставаясь важными составляющими процесса проведения клинических исследований [8–11].

В настоящее время в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют структурированные данные, позволяющие оценить восприятие здоровыми добровольцами участия в исследованиях биоэквивалентности. Недостаток данной информации, способной помочь пониманию, насколько были оправданы ожидания участников КИ, а также характерных страхов и сдерживающих факторов, влияющих на принятие решения, несомненно отрицательно влияет на развитие данного сектора клинических исследований в нашей стране.

На сегодняшний день в России и в мире проведены и опубликованы результаты небольшого количества исследований, характеризующих различные аспекты мотивации и восприятия участия пациентов с различными нозологиями в КИ [12, 13]. Однако в связи с наличием достаточного числа рисков, таких как включение в группу плацебо, новый исследуемый препарат и социально-экономические факторы, экстраполировать полученные данные на здоровых добровольцев не представляется возможным. Проведение подобного рода исследований заинтересованности, оценки причин участия или отказа от него может иметь существенное значение для планирования и выполнения исследований биоэквивалентности, а в целом позволит оптимизировать и повысить уровень комплаенса.

С целью оценки ожиданий, мотивации и опыта участия здоровых добровольцев в исследованиях биоэквивалентности нами было спланировано и проведено одномоментное наблюдательное исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнялось на базе отделения терапевтического лекарственного мониторинга клиники НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (г. Томск), проводилось по единому протоколу в соответствии с принципами надлежащей клинической практики. В качестве респондентов включались здоровые добровольцы, принимающие участие в исследованиях биоэквивалентности.

В рамках протокола опыт участия определялся как факт подписания информированного согласия и проведение всех запланированных процедур как минимум одного визита клинического исследования, разрешённого Министерством здравоохранения России. Гарантом выполнения процедур протокола являлся главный исследователь центра, который проводил оценку критериев включения и предоставлял ссылку на вопросник участникам.

Основным методом являлось анкетирование здоровых добровольцев. В рамках исследования респондентам, имеющим опыт участия в КИ и соответствующим критериям включения, однократно было предложено самостоятельно заполнить вопросник. Главный исследователь, персонал исследовательского центра не влияли и не могли ознакомиться с ответами участников.

Для статистической обработки результатов исследования был использован пакет программ Statistica for Windows (ver. 10.0), Statsoft, США. При сравнении частот качественных признаков использовался критерий χ^2 или 2-сторонний критерий Фишера. Для оценки различия средних в попарно не связанных выборках применяли U-критерий Манна – Уитни. Для оценки вероятностей использовали программу StatCalc (ver. 6), AcaStat Software, США. Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные – в виде X±x, где X – среднее арифметическое, x – стандартное отклонение. Разницу значений считали значимой при $p<0,05$.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В исследование было включено 137 здоровых добровольцев, средний возраст которых составил 27,49±5,19 лет. В исследуемой выборке мужчины и женщины были сопоставимы как по возрасту [26,77±4,78 лет (n=88) vs 28,78±5,70 лет (n=49)], так и по гендерному признаку [ОШ 1,33 (95% ДИ 0,93 до 1,90)].

Относительно семейного положения респонденты разделились примерно в равных количествах: «состояли в браке» (n=68; 49,6%), «никогда не были женаты/замужем» (n=62; 45,3%). Больше половины всех участников имели высшее образование (n=72; 52,6%), у каждого третьего было неоконченное высшее (n=37; 27,0%), и лишь у каждого пятого – полное среднее образование (n=26; 19,0%).

В качестве своего социального положения большинство анкетируемых указали «рабочий» (n=66; 48,2%), второй по популярности категорией были «учащиеся/студенты» (n=33; 24,1%), и в одинаковых количествах в выборке были представлены «служащие» (n=11; 8,0%) и «домохозяйки/безработные» (n=11, 8,0%).

Большая часть респондентов оценили свой месячный уровень дохода на одного члена семьи в пределах от 15 до 20 тысяч рублей (n=47; 34,3%), затем по частоте ответов был доход на уровне 25–30 тысяч рублей (n=32; 23,4%), приблизительно в равных количествах в качестве ответа указали доход более 30 тысяч рублей в месяц (n=24; 17,5%) и от 10 до 15 тысяч рублей в месяц (n=21; 15,3%), и самым редким был ответ менее 10 тысяч рублей в месяц (n=13; 9,5%).

На момент опроса все добровольцы принимали участие в исследовании биоэквивалентности, при этом более 80% (n=113) анкетируемых «участвовали ранее» и лишь каждый пятый из опрошенных «участвовал впервые» (n=24; 17,5%).

В среднем каждый доброволец принял участие в четырех исследованиях биоэквивалентности (n=113, 4,0±3,76), в 5 и более исследованиях приняли участие 32 респондента (23,4%), более чем в 10 – 14 анкетируемых (10,2%).

Таким образом, по данным нашего опроса, портрет участника исследования биоэквивалентности выглядит следующим образом: это холостой или женатый мужчина около 30 лет, рабочий, с высшим образованием и уровнем дохода от 15 до 20 тысяч рублей на одного члена семьи, который принял участие как минимум в четырех клинических исследованиях и полностью их закончил.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Принятие решения и мотивация участия

Для того чтобы проанализировать мотивирующие причины участвующих в исследовании биоэквивалентности добровольцев, им задавали вопрос: «Какие факторы для Вас были наиболее важными при принятии решения об участии в клиническом исследовании?», предлагая оценить их по пятибалльной шкале, где 1 – «совсем неважно», 2 – «недостаточно важно», 3 – «достаточно важно», 4 – «очень важно» и 5 – «чрезвычайно важно» (таблица 1)

Таблица 1.

Оценка важности факторов при принятии решения об участии в клиническом исследовании

Факторы	Средний балл			p*
	Общий	Мужчины	Женщины	
Получение денежного вознаграждения	3,96±0,87	4,07±0,88	3,76±0,83	0,044
Регулярное наблюдение за моим состоянием	3,48±0,92	3,53±0,95	3,39±0,86	0,372
Наблюдение профессиональными специалистами	3,42±0,97	3,48±1,04	3,33±0,83	0,384
Внести свой вклад на пользу обществу	3,25±0,99	3,34±1,1	3,08±0,73	0,143
Возможность пройти дополнительные обследования	3,22±1,03	3,28±1,15	3,1±0,74	0,322
Более качественная медицинская помощь	3,18±1,01	3,14±1,08	3,24±0,88	0,550
Получение новых данных об исследуемом препарате	2,95±1,01	2,94±1,12	2,96±0,79	0,930
Знание о том, что я могу прекратить участие в любой момент	2,94±1,06	2,89±1,17	3,04±0,82	0,414

Примечание: * – женщины в сравнении с мужчинами.

Ответы добровольцев расположились в диапазоне от «совсем неважно» до «чрезвычайно важно». Наиболее важным мотиватором для опрошенных являлось получение денежного вознаграждения, причем при проведении сравнительного анализа было выявлено достоверное различие в том, что для участников мужского пола данный фактор являлся более приоритетным, чем для женского. В качестве менее важных факторов респонденты отмечали наблюдение профессиональными специалистами, регулярное наблюдение за состоянием, более качественную медицинскую помощь и возможность внести свой вклад на пользу обществу. Из опроса было выяснено, что наименее значимыми являлись такие факторы, как получение новых данных об исследуемом препарате и знание о том, что добровольцы могут прекратить участие в любой момент.

Далее с целью оценки моментов, негативно влияющих на принятие решения, респондентов спросили о том, «какие факторы отрицательно влияли на интерес/желание участвовать в исследовании», и также оценили их по пятибалльной шкале (таблица 2).

Ответы добровольцев распределились в диапазоне от «совсем не важно» до «очень важно», при этом самым важным фактором являлся риск побочных явлений. Остальные факторы оказывали значительно меньшее влияние на отрицательный интерес

к участию, а наименее существенной была необходимость прохождения обследований и процедур.

Таблица 2.

Оценка важности факторов, отрицательно повлиявших на интерес к участию в клиническом исследовании

Факторы	Средний балл			p*
	Общий	Мужчины	Женщины	
Риск побочных явлений	3,04±1,09	3,03±1,18	3,06±0,92	0,890
Соблюдение ограничений исследования	2,47±1,1	2,47±1,18	2,49±0,94	0,903
Новый исследуемый препарат	2,45±1	2,41±1,04	2,51±0,94	0,572
Необходимость нахождения в клинике более суток и ее последующего регулярного посещения	2,42±1,16	2,43±1,22	2,41±1,06	0,910
Необходимость проходить обследования и процедуры	2,16±1,07	2,2±1,16	2,08±0,91	0,522

Примечание: * – женщины в сравнении с мужчинами.

При ответе на вопрос: «Кто Вам помогал принять решение об участии в исследовании?» – были получены следующие результаты: более половины опрошенных (n=71, 51,8%) принимали решение самостоятельно, 51 человек (37,2%) прибегал к совету друзей и знакомых и лишь 14 опрошенных (10,2%) обсуждали возможность своего участия с членами семьи.

Информированное согласие

Ознакомление с информированным согласием является одним из важнейших элементов системы, гарантирующей этичность процедур клинических исследований. По данным проведенного опроса, более 80% добровольцев знакомились с информированным согласием самостоятельно (n=113; 82,5%), 17 человек (12,4%) читали данный документ вместе с врачом и 7 опрошенным (5,1%) документ читал врач.

Процесс ознакомления с информированным согласием у добровольцев в среднем занимал около 40 мин (0,61±0,7 ч). При этом большинство респондентов (n=102; 74,5%) знакомились с информированным согласием в клинике, а каждый четвертый (n=35; 25,5%) брал домой.

С целью описания картины восприятия представленной информации добровольцам было предложено оценить сложность текста информированного согласия, ответив на вопрос: «Насколько сложно для Вас было понять текст информированного согласия?», по пятибалльной шкале от 1 («совсем несложно») до 5 («чрезвычайно сложно»).

В среднем сложность была оценена в диапазоне от «совсем несложно» до «несколько сложно», средний балл составил 1,22±0,64. Доступность понимания участниками исследования текста информированного согласия также подтверждалась тем фактом, что практически у 75% (n=102) опрошенных не возникало вопросов при ознакомлении с ним. У 35 человек возникали вопросы, 29 из которых задали их врачу-исследователю, далее оценив полноту и понятность ответов в диапазоне от «достаточно понятно» до «очень понятно» – средний балл 4,03±0,76 (мужчины – 4,2±0,73, женщины – 3,71±0,71, p=0,0002).

После прочтения информированного согласия респонденты отмечали отсутствие изменения интереса и его увеличение к участию в клиническом исследовании (3 – «интерес не изменился», 4 – «интерес увеличился», 5 – «интерес значительно увеличился»), средний балл ответа составил 3,18±0,56.

Опыт участия в клиническом исследовании

В ходе анкетирования добровольцам также было предложено ответить на вопрос о том, насколько обременительным для них было посещение клиники во время участия в клиническом исследовании, и оценить свой ответ по пятибалльной шкале. Средний результат составил 1,65±0,79, где 1 – «совсем нет», 2 – «несколько обременительно», что говорит о достаточном комфорте во время визитов в клинику. Для оценки сложности процедур исследования участвующих спрашивали: «Насколько обременительными было для Вас соблюдение ограничений исследования?».

Таблица 3.

Оценка сложности выполнения процедур в ходе проведения клинического исследования

	Средний балл			p*
	Общий	Мужчины	Женщины	
Дополнительные визиты в клинику	1,86±0,9	1,9±0,94	1,8±0,84	0,528
Ограничения в приеме пищи и воды	1,81±0,96	1,89±1,03	1,67±0,8	0,214
Ограничения физической активности	1,78±0,99	1,82±0,97	1,71±1,04	0,558
Ограничения позы и сна	1,74±1,02	1,82±1,09	1,59±0,86	0,213
Ограничения в диете	1,69±0,85	1,75±0,87	1,57±0,79	0,238
Установка в/в катетера и частые заборы крови	1,47±0,75	1,48±0,77	1,47±0,71	0,953
Ограничения приема алкоголя и табакокурения	1,27±0,83	1,41±1	1,02±0,14	0,008

Примечание: * – женщины в сравнении с мужчинами.

Все респонденты оценили ограничения в диапазоне от 1 («совсем не обременительно») до 2 («несколько обременительно»). В качестве наиболее обременительных факторов добровольцы указали дополнительные визиты в клинику, ограничения в приеме пищи и воды, ограничение физической активности, ограничения позы и сна и ограничение в диете. Менее стесняющими их привычный образ жизни опрошенные назвали установку внутривенного катетера и частые заборы крови, а также ограничения приема алкоголя и табакокурения. Однако при проведении статистического анализа нами было выявлено гендерное различие по данному ограничению, отказ от вредных привычек мужчинами переносился достоверно тяжелее. В ходе опроса нами также было выяснено, что абсолютное большинство респондентов (n=132; 96,4%) не испытывали сомнений по поводу продолжения своего участия в исследовании.

С целью понимания специфики и важности мотивирующих факторов добровольцев спрашивали: «Какие важные факторы мотивировали Вас продолжать участие в исследовании?»; все мотиваторы оценивались по пятибалльной шкале, где 1 – «совсем неважно», 2 – «недостаточно важно», 3 – «достаточно важно», 4 – «очень важно» и 5 – «чрезвычайно важно» (таблица 4).

Таблица 4.

Оценка важности факторов, мотивировавших добровольцев продолжать участие в исследовании

	Средний балл			p*
	Общий	Мужчины	Женщины	
Получение денежного вознаграждения	3,86±0,82	3,92±0,85	3,76±0,78	0,262
Постоянное наблюдение за моим состоянием	3,14±0,93	3,16±0,99	3,1±0,82	0,733
Бесплатное обследование и медицинская помощь	3,07±0,96	3,16±0,96	2,92±0,95	0,160
Мои отношения с врачами-исследователями	3±1,05	3±1,09	3±0,98	1,000
Негласное обещание, договоренность (чувство ответственности)	2,98±1,11	2,83±1,17	3,24±0,95	0,035

Примечание: * – женщины в сравнении с мужчинами.

Исходя из полученных результатов, можно судить о том, что наиболее сильным мотиватором для опрошенных являлось финансовое вознаграждение за участие в исследовании, средний балл ответов составил 3,86±0,82. Остальные причины, такие как постоянное наблюдение за состоянием, бесплатное обследование и медицинская помощь и отношения с врачами-исследователями, расценивались участниками как менее важные. Исходя из полученных нами данных, чувство ответственности было самым слабым мотиватором продолжения участия в исследовании, при оценке которого также были выявлены гендерные различия.

В ходе опроса большая часть участников указывала в качестве основных мотиваторов себя (n=126, 92,0%), 9 добровольцев (6,6%) отнесли к этой категории семью и знакомых и по 1 опрошенному (0,7%) отметили, что их стимулировали к участию другие участники исследования и врачи-исследователи.

Для оценки удовлетворенности ожиданий респондентам было предложено ответить на вопрос: «Насколько участие в исследовании оправдало ожидание?», оценив ответ по пятибалльной шкале от 1 («совсем не оправдало») до 5 («чрезвычайно оправдало»). В среднем ожидания от участия были оправданы и оценены в диапазоне от «достаточно оправдало» до «очень оправдало», средний балл составил 3,45±0,80. При этом у мужчин ожидания оправдались в большей степени, чем у женщин (3,57±0,85 vs 3,22±0,65, p=0,016).

При ответе на вопрос: «Согласитесь ли вы в будущем принять участие в исследовании?» – 97,1% респондентов (n=133) были готовы принять участие в клиническом исследовании в будущем, 3 человека (n=2,2) выразили сомнение по поводу своего повторного участия и только 1 (0,7%) ответил отрицательно.

В ходе проведения клинического исследования более половины добровольцев (n=86, 62,8%) редко обсуждали свое участие и впечатления с окружающими, 28 (20,4%) участников довольно часто разговаривали на эту тему и 23 (16,8%) никогда не делились своим опытом. При этом 125 (91,2%) опрошенных порекомендуют участие в исследовании своим знакомым и родственникам. Из опроса было выяснено, что менее половины (n=63, 46,0%) участников поддерживают контакт с врачами клинического центра, чтобы быть в курсе предстоящих исследований.

В качестве источника информации о возможности участия в исследовании большинство добровольцев указали своих друзей и знакомых (n=106; 77,4%), из Интернета информацию получили 16 человек (11,7%), от врачей узнали 12 (8,8%). Среди других источников информации СМИ указал только 1 респондент (0,7%) и 2 участникам (1,5%) позвонили из исследовательского центра.

Таким образом, согласно полученным данным, основным мотивационным фактором при принятии решения об участии в КИ был финансовый интерес респондентов. По результатам зарубежных исследо-

вателей, денежное вознаграждение чаще всего является основным фактором мотивации для здоровых добровольцев [6, 14–17]. Так, по данным L. Almeida и др. (2007), финансовое вознаграждение было наиболее важным по сравнению с остальными факторами и при этом оценивалось выше субъектами с более низкими ежемесячным доходом и уровнем образования ($p<0,01$ и $p<0,05$ соответственно) [14]. Следует отметить, что среди наших респондентов у каждого второго было высшее образование и каждый четвертый имел неоконченное высшее образование. Что касается доходов, то половина респондентов указала доход в диапазоне от 15 до 30 тыс. рублей в месяц, в то время как только каждый пятый участник КИ имел доход более 30 тыс. руб. В то же время, по данным официальной статистики по Томской области, среднемесячная номинальная начисленная заработная плата работников организаций составляет более 34 тысяч рублей (данные за 2015 год), таким образом, большинство респондентов, принявших участие в опросе, имеют доход ниже среднего для Томской области. Лишь некоторые исследования отмечают неальтруистические факторы как основные при принятии решения об участии. Так, в исследовании, проведенном в Малави (2008), главным фактором мотивации оказалась возможность проверить состояние здоровья [18], а по данным, полученным во Франции (2015), основной причиной при принятии решения было собственно желание поддержать исследование [19]. Таким образом, материальная компенсация за участие в исследовании является главным мотивационным фактором не только по нашим данным, но и по результатам зарубежных ученых.

В мировом сообществе до сих пор не решен вопрос о том, как влияет денежная компенсация на оценку рисков и выгоды участия, так как рекрутинг материально неблагополучных добровольцев путем финансовой компенсации является неэтичным. Кроме определения мотивирующих причин, нами были оценены факторы, которые отрицательно повлияли на участие в исследовании: с помощью данной части анкеты мы можем косвенно судить об оценке рисков добровольцами. Для участников нашего исследования самыми важными оказались риск побочных явлений, соблюдение ограничений исследования и исследование нового препарата. Таким образом, исходя из полученных нами результатов, можно сделать вывод, что, хотя денежные выплаты и повлияли положительным образом на привлечение добровольцев в исследование, участники адекватно оценивают риски участия в КИ. По сообщению L. Almeida и др. (2007), большинство респондентов (опрос здоровых добровольцев-участников КИ I фазы, n=111, 81,6%) на вопрос о появлении возможных серьезных осложнений ответили, что они никогда не чувствовали, что подвергаются какому-либо риску, 16% респондентов сообщили, что у них периодически возникали опасения по поводу возможных рисков, и только 2% участников заявили, что они подвергались риску за время исследования, при этом ученые не нашли корреляций между оценкой риска и какими-либо социально-демографическими характеристиками [14].

По нашим данным, гораздо менее значимыми для респондентов оказались требования по соблюдению ограничений и необходимость следовать протоколу исследования. Кроме того, респонденты не считают обременительными сами процедуры исследования, участники опроса оценили ограничения, которым они подвергались за время КИ, в диапазоне от «совсем не обременительно» до «несколько обременительно», при этом самый обременительный фактор (дополнительные визиты в клинику) набрал всего 1,86±0,9 балла. Низкий балл по указанным выше факторам может свидетельствовать о том, что добровольцы готовы к более высокой организационной и клинической нагрузке, данный тезис подтверждается и другими исследованиями [11, 14, 20], в том числе проведенным нами ранее исследованием [12].

Кроме того, нами были оценены факторы мотивации продолжения участия в КИ. Как и в случае с факторами, влиявшими на принятие решения, самой главной причиной оказалась денежная компенсация. Несколько ниже были оценены другие мотивы (неальтруистические): постоянное наблюдение за состоянием добровольцев и оказание бесплатной медицинской помощи. При этом два предложенных варианта, оценивающих отношения с врачами, – «мои отношения с врачами-исследователями» и «негласное обещание, договоренность» – были оценены ниже всего.

При проведении нашего опроса мы также попытались оценить аспекты ознакомления с информированным согласием среди участников КИ и влияние на участие в исследовании. Согласно нашим результатам, среднее время ознакомления с формой ИС составило 40 мин, четверть анкетируемых брали форму ИС домой для ознакомления и только у каждого четвертого возникали вопросы к исследователю, а сложность текста ИС по результатам опроса оказалась невысокой. С одной стороны, данные результаты можно объяснить тем фактом, что более 80% респондентов уже участвовали в КИ и только 17,5% принимали участие впервые. С другой стороны, полученных данных недостаточно для объективной оценки степени понимания добровольцами формы ИС, достаточности указанного времени для принятия решения об участии, и поэтому нельзя сделать выводы о том, насколько действительно сложной является форма согласия для участников. По данным исследования, опубликованного в 2008 году, в котором оценивалось понимание ИС здоровыми добровольцами, только 17% смогли назвать три или более потенциальных рисков, которым они могут подвергаться во время КИ, в то время как 20% не могли

идентифицировать ни одного [21]. Таким образом, вопрос понимания ИС участниками исследования требует дополнительного изучения.

Отметим, что в целом участие в КИ оправдало ожидания добровольцев, большинство респондентов порекомендуют в дальнейшем участие в КИ своим знакомым и родственникам, а также готовы снова поучаствовать в исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты в целом согласуются с результатами исследований, проведенными в других странах. Основным фактором мотивации для участия в КИ и стимулом для продолжения исследования у здоровых добровольцев является материальная компенсация, при этом, по нашим данным, большинство респондентов имели доходы ниже среднего по сравнению со средней заработной платой в Томской области, а также неоднократно участвовали в исследованиях биоэквивалентности, что косвенно свидетельствует о вынужденном участии со стороны некоторых добровольцев и вероятном этическом конфликте при проведении исследований биоэквивалентности. Тем не менее респонденты адекватно оценивают риски участия в КИ, и, вероятно, материальное вознаграждение не имеет решающего значения при принятии решения об участии в исследовании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ассоциация организаций по клиническим исследованиям. Информационно-аналитический бюллетень №14 (2016). URL: http://acto-russia.org/files/bulletin_14.pdf (дата обращения 06.10.2017 г.)
2. CRO Synergy Research Group. Clinical Trials in Russia Orange Paper. Year 2016. URL: http://synergycro.ru/orange_paper/SynRG_Orange_Paper_Y2016.pdf (дата обращения 06.10.2017)
3. Реестр разрешенных клинических исследований / Министерство здравоохранения Российской Федерации. URL: http://www.grls.rosminzdrav.ru/ClPermitionReg.aspx (дата обращения 06.10.2017)
4. EMA versus US-FDA regulatory requirements regarding bioequivalence of orally administered generics (2014). URL: http://dgra.de/media/pdf/studium/masterthesis/master_heiss_k.pdf (дата обращения 06.10.2017)
5. Решение Совета Евразийской экономической комиссии №85 от 03.11.2016 г. «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».
6. О.Г. Мелихов. Что думает население России о клинических исследованиях? // Ремедиум. 2007. № 10. С. 10–13.
7. J.G. Ford, M.W. Howerton, G.Y. Lai, T.L. Gary, S. Bolen, M.C. Gibbons, J. Tilburt, C. Baffi, T.P. Tanpitukpongse, R.F. Wilson, N.R. Powe, E.B. Bass. Barriers to recruiting underrepresented populations to cancer clinical trials: a systematic review // Cancer. 2008. V. 112(2). P. 228–242.
8. J. Bigorra, J.E. Baños. Weight of financial reward in the decision by medical students and experienced healthy volunteers to participate in clinical trials // European journal of clinical pharmacology. 1990. V. 38(5). P. 443–446.
9. M. Stones, J. McMillan. Payment for Participation in Research: A Pursuit for the Poor? // Journal of Medical Ethics. 2010. V. 36(1). P. 34–36.
10. E.A. Largent, C. Grady, F.G. Miller, A. Wertheimer. Money, Coercion, and Undue Inducement: Attitudes about Payments to Research Participants // IRB: Ethics & Human Research. 2012. V. 34(1). P. 1–8.
11. L. Stunkel, C. Grady. More than the money: a review of the literature examining healthy volunteer motivations // Contemporary Clinical Trials. 2011. V. 32(3). P. 342–352.
12. Е.С. Куликов, И.А. Деев, О.С. Кобякова, О.И. Звонарева, О.С. Федорова, Н.А. Кириллова, Е.А.Старовойтова, Н.Г. Жукова, И.А. Жукова, В.В. Есип, Е.Д. Счастный, Н.В. Хурхурова, Л.Ю. Никитина, Т.Г. Голосова, Пименов И.Д., М.А.Нетаева, С.В. Федосенко. Клиническое исследование глазами пациента: мотивация, ожидания, восприятие // Клиническая медицина. 2017. № 95(8). С. 751–757.
13. J.A. Fisher. Expanding the Frame of Voluntariness in Informed Consent: Structural Coercion and the Power of Social and Economic Context // Kennedy Institute of Ethics Journal. 2013. V. 23(4). P. 355–379.
14. L. Almeida, B. Azevedo, T. Nunes, M. Vaz-da-Silva, P. Soares-da-Silva. Why healthy subjects volunteer for phase I studies and how they perceive their participation? // European journal of clinical pharmacology. 2007. V. 63(11). P. 1085–1094.
15. R. Hermann, D. Heger-Mahn, M. Mahler, M. Seibert-Grafe, C. Klipping, K. Breithaupt-Grögler, C. de Mey. Adverse events and discomfort in studies on healthy subjects: the volunteer's perspective. A survey conducted by the German Association for Applied Human Pharmacology // European journal of clinical pharmacology. 1997. V. 53(3–4). P. 207–214.
16. S.A. Nappo, G.B. Iafrate, Z.M. Sanchez. Motives for participating in a clinical research trial: a pilot study in Brazil // BMC Public Health. 2013. V. 13. P. 1–9.
17. C.L. Tishler, S. Bartholomae. The Recruitment of Normal Healthy Volunteers: A Review of The Literature on the Use of Financial Incentives // Journal of Clinical Pharmacology. 2002. V. 42. P. 365–375.
18. N. Mtunthama, R. Malamba, N. French, M.E. Molyneux, E.E. Zijlstra, S.B. Gordon. Malawians permit research bronchoscopy due to perceived need for healthcare // Journal of medical ethics. 2008. V. 34(4). P. 303–307.
19. Q. Luzurier, C. Damm, F. Lion, C. Daniel, L. Pellerin, M.P. Tavolacci. Strategy for recruitment and factors associated with motivation and satisfaction in a randomized trial with 210 healthy volunteers without financial compensation // BMC medical research methodology. 2015. V. 15. P. 1–9.
20. C.E.M. van Gelderen, T.J.E. Savelkoul, W. van Dokkum, J. Meulenbelt. Motives and perception of healthy volunteers who participate in experiments // European journal of clinical pharmacology. 1993. № 45. P. 15–21.
21. P. Fortun, J. West, L. Chalkley, A. Shonde, C. Hawkey. Recall of informed consent information by healthy volunteers in clinical trials // The Quarterly Journal of Medicine. 2008. № 101. P. 625–629.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ИНЖИНИРИНГ ОТ ГК «ФАРМКОНТРАКТ»

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

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

1 burkle

ОТБОР ПРОБ

Пробоотборники



ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ ОБРАЗЦА

2 Мельницы IKA

IKA®



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.1 УПАРИВАНИЕ ПРОБЫ
Ротационный испаритель
BUCHI R-300

BUCHI



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.2 ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ
твердофазный экстрактор
SPE-DEX 4790

Horizon technology



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.3 Сушильный шкаф BINDER

BINDER
Best conditions for your success



4 BUCHI

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ

БИК-Фурье BUCHI



4.1 ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
Атомно-абсорбционный спектрофотометр
Agilent 240

Agilent Technologies



4.2 АНАЛИЗ ВЛАЖНОСТИ
Титратор 831 KF от Metrohm AG

Metrohm



4.3 АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ
ВЭЖХ-система
Agilent 1260 Infinity

Agilent Technologies



4.4 АНАЛИЗ БЕЛКА/АЗОТА МЕТОДОМ КЬЕЛЬДАЛЯ
Системы BUCHI

BUCHI



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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАЛЕПЛОНА, ЗОЛПИДЕМА И ЗОПИКЛОНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

В.А. Карташов[1], Г.П. Чепурная[1]*, Л.В. Чернова[1]

Резюме. Снотворные препараты третьего поколения – Z-препараты: залеплон (анданте), зопиклон (имован) и золпидем (ивадал) – широко применяются в медицине для лечения инсомний. Несмотря на ряд преимуществ перед производными барбитуровой кислоты и 1,4-бензодиазепина, указанные препараты обладают токсичностью. Описаны случаи отравлений, в том числе со смертельным исходом. Для диагностики интоксикаций указанными лекарственными средствами и других целей (для мониторинга концентрации указанных веществ в крови, изучения фармакокинетики, оценки лекарственного взаимодействия, оптимизации контроля за лечением) важное значение приобретает разработка методов определения Z-препаратов в биологических объектах, которые в настоящее время разработаны недостаточно. Поэтому целью настоящей работы является изучение и анализ специальной литературы, посвящённой химическим, физико-химическим, фармакологическим свойствам, методам анализа исследуемых веществ, способам их экстрагирования, очистки, методам идентификации и количественного определения при исследовании биологических объектов.

Ключевые слова: инсомния, Z-препараты, биологические объекты, идентификация, количественное определение.

DEFINITION OF ZALEPLON, ZOLPIDEM AND ZOPICLON IN BIOLOGICAL OBJECTS

V.A. Kartashov[1], G.P. Chepurnaya[1]*, L.V. Chernova[1]

Abstract. Soporific substances of the third generation – Z-preparations: Zaleplon (Andante), Zopiclone (Imovane) and Zolpidem (Ivadal) – are widely used in medicine for the treatment of insomnia. Despite a number of advantages over of barbiturate derivatives and 1,4-benzodiazepine,the identified preparations are toxic. Poisoning incidents, including fatalities, are described. To diagnose intoxications by these medicines and other purposes (for monitoring the concentration of these medicines in the blood, studying pharmacokinetics, evaluating drug interactions, optimizing treatment control), the development of methods for defining Z-preparations in biological objects becomes important, that is currently developed insufficient. Therefore, the purpose of this work is to study and analyze the specialized literature on the chemical, physico-chemical, pharmacological properties, methods of analysis of investigated substances, methods of extraction, purification, methods of identification and quantification while studying the biological objects.

Keywords: insomnia, Z-preparations, biological objects, identification, quantitative determination.

1 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», 385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Советская, д. 197-а

1 – Maykop State Technological University, 197-a, Sovetskaya str., Maykop, 385000, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

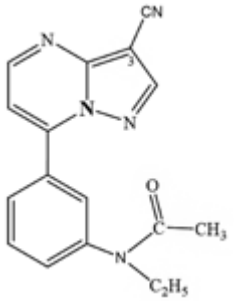
Инсомния (бессонница) продолжает сохранять своё медицинское и социальное значение. Некоторые авторы считают, что нарушениями сна страдает почти половина населения планеты, поэтому снотворные средства являются предметом постоянного внимания учёных в области медицины и практикующих врачей. Несмотря на все многообразие имеющихся снотворных препаратов, проблема нарушения сна остается актуальной. Препараты первого поколения – барбитураты – сегодня практически не применяются, так как вызывают зависимость и обладают токсичностью. Снотворные средства другой группы – 1,4-бензодиазепины – менее токсичны, однако они также вызывают лекарственную зависимость и, кроме того, оказывают седативное действие, тем самым способствуя развитию дневной сонливости и когнитивных нарушений [1, 2]. Появление нового, третьего, поколения снотворных препаратов стало значительным шагом в лечении инсомний. Одними из главных представителей этого класса являются залеплон, золпидем и зопиклон, которые широко и эффективно используют в медицинской практике за рубежом, а в последние годы и в России. Кроме того, из этой группы препаратов применяется правовращающий стериоизомер зопиклона – эсзопиклон.

В настоящее время эти препараты активно изучаются в различных направлениях: химическом, клиническом, фармакологическом, токсикологическом и др.

По химическому строению залеплон, золпидем и зопиклон – производные пиразолпиримидина, имидазопиридина и пирролопиразина соответственно. Они являются азотсодержащими

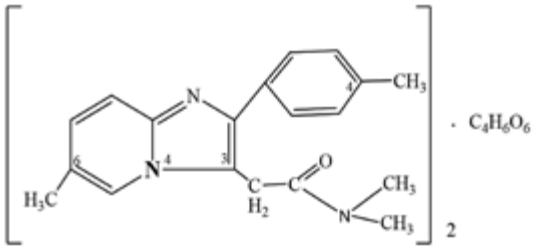
веществами основного характера, обладают гидрофобностью, т.к. содержат в своих структурах сложноэфирные группы, атомы галогенов, циклы и другие гидрофобные фрагменты.

ЗАЛЕПЛОН



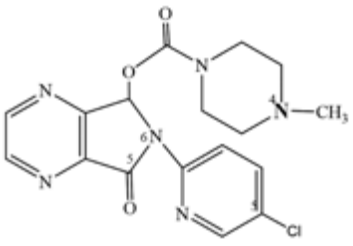
Залеплон (Zaleplonum) (N-[3-(цианопиразоло[1,5-a]пиримидин-7-ил)фенил]-N-этилацетамид) является производным пиразолпиримидина. Залеплон – белый или почти белый порошок, практически нерастворим в воде, труднорастворим в этаноле и пропиленгликоле, умерено растворим в ацетоне, легкорастворим в диметилформамиде, log P (октанол/вода) 1,23 в диапазоне значений pH 1-7 [3–8]. Препараты залеплона окрашены в ярко-синий цвет (индигокармин).

ЗОЛПИДЕМ



Золпидем (Zolpidem, Ivadal, Ambien) (N,N,6-триметил-2-(4-метилфенол)имидазоло[1,2-a]пиридин-3-ацетамид (тартрат)) является производным имидазопиридина [6, 9–12]. Золпидем – белый или почти белый кристаллический порошок. Практически нерастворим в метиленхлориде, малорастворим в воде, умеренно растворим в спирте и пропиленгликоле [6, 13, 14], pKa=6,2, log P=3,85 [15, 16].

ЗОПИКЛОН



Зопиклон (Zopiclone) (6-(5-хлор-2-пиридил)-[(4-метилпиперазин-1-ил)-карбонилокси]-5,6-дегидропирроло[3,4-b]пиразин-5-он) является производным пирролопиразина (циклопирролона), представляет собой рацемическую смесь двух стериоизомеров [17–19]. Это белый или слегка желтоватый кристаллический порошок, легко растворимый в хлороформе, метиленхлориде, диметилформамиде и 0,1 н растворе соляной кислоты, практически нерастворим в воде, эфире и этаноле, малорастворим в ацетоне, растворяется в разбавленных минеральных кислотах, pKa=7,11, log P=1,54 [17, 19, 20].

ЭСЗОПИКЛОН

Eszopiclone (S-zopiclon, Lunesta, Estorra, Zopiclone-Sepracor) является правовращающим стериоизомером зопиклона –(+)-(S)-изомер. В настоящее время применяется в США в качестве снотворного средства.

По фармакологической классификации названные препараты относятся к группе снотворных средств третьего поколения [6, 9, 12, 21–25]. В зарубежной литературе их часто называют Z-препаратами, Z-лекарствами, Z-снотворным, небензодиазепиновыми снотворными, бензодиазепиноподобными средствами [6, 9, 10, 25–32]. Последние названия связаны, по-видимому, с тем, что Z-препараты и бензодиазепины сходны по механизму действия: они взаимодействуют с одним и тем же ГАМКА – бензодиазепиновым рецепторным комплексом, местами с ω-бензодиазепиновых α-субъединиц. К настоящему времени выявлена гетерогенность бензодиазепинового рецептора и определены локализация и функции его основных подтипов: ω_1, ω_2 и ω_5. Подтип ω_1 расположен преимущественно в вертикальной и субкортикальной областях и ответствен за появление собственно гипнотического действия, тогда как подтипы ω_2 и ω_5 локализируются главным образом в спинном мозге и периферических тканях и связаны с возникновением множества других эффектов. Таким образом, последнее поколение гипнотиков (Z-препараты: залеплон, золпидем и зопиклон) отличается от бензодиазепинов по фармакокинетике и фармакодинамике наибольшей степенью селективности к ω_1-подтипам бензодиазепинового рецептора, которые в соответствии с современными представлениями непосредственно связаны с появлением «чистого» гипнотического эффекта [21, 33]. Кроме того, отличаясь по химическому строению, каждый из Z-препаратов обладает индивидуальным фармакокинетическим профилем, отличается по биодоступности, объёму распределения, периоду полувыведения, продуктам биотрансформации [33–35].

Исследуемые препараты обладают побочными действиями, общими из которых являются сонливость, вялость, утомляемость, головная боль, сухость во рту, боль в животе, диспепсия, зуд, кожная сыпь, головокружение, раздражительность, спутанность сознания,

подавленное настроение, депрессия, парадоксальные реакции (усиление бессонницы, ночные кошмары, возбуждение, агрессивность, приступы гнева, галлюцинации), нарушения поведения [12, 21–24, 30, 35–39]. Кроме того, при длительном применении развивается лекарственная зависимость и привыкание [12, 22, 32, 37, 39, 40–42]. Авторы [22] отнесли залеплон, золпидем и зопиклон к наркотическим средствам, вызывающим зависимость; в источнике [43] они включены в список галлюциногенов. Неблагоприятное влияние на когнитивные функции Z-препаратов указано в статье [43]. В работах [36, 38, 39] выявлено отрицательное влияние залеплона и зопиклона на время последовательного реагирования, логическое мышление, способность к последовательному вычислению, мультизадачный тест; ухудшение способности управлять автомобилем через час после приёма терапевтических доз залеплона и даже через 10 ч после приёма золпидема и зопиклона. У пациентов старше 65 лет, принимавших Z-препараты, на 50% повышался риск развития болезни Альцгеймера, в пять раз увеличивался риск преждевременной смерти [9]. В источнике [6] сообщается о значительных повреждающих эффектах залеплона золпидема и зопиклона, в том числе о повышении злокачественных заболеваний мозга, лёгких, кишечника, груди, мочевого пузыря и кожи по сравнению с плацебо. Многие исследователи считают, что побочные эффекты Z-лекарств практически не отличаются от побочных действий бензодиазепинов. В отечественной и зарубежной литературе приведены многочисленные случаи как смертельных, так и не смертельных отравлений залеплоном, золпидемом и зопиклоном, несмотря на их низкий по сравнению с бензодиазепинами летальный токсический индекс [27, 44].

В связи с вышеизложенным определение Z-препаратов в биологических объектах (крови, плазме, моче, слюне, волосах, тканях внутренних органов и др.) имеет важное значение для мониторинга концентрации указанных веществ в крови, изучения фармакокинетики, оценки лекарственного взаимодействия, оптимизации контроля за лечением, диагностики смертельных и не смертельных отравлений и для других целей. Поэтому в зарубежной и отечественной специальной литературе описаны методы определения указанных веществ в биологических объектах, причём как индивидуальных соединений, так и их смесей.

Для изолирования залеплона, золпидема, зопиклона и их метаболитов из различных биологических объектов использовались экстракционные методы. Так, для выделения из жидких образцов (крови, плазмы, мочи, слюны или водных извлечений из образцов тканей) были применены варианты жидкостной и твёрдофазной экстракции. В некоторых случаях, особенно для экстракции метаболитов, авторы предварительно проводили кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз, например [33, 45–51]. Для жидкостной экстракции, выполняемой, как правило, при pH 8,0–10,5, были использованы различные органические растворители или смеси растворителей: хлороформ [5, 15, 52, 53], хлороформ-1 – бутанол (6:1) [40, 54] и (9:1) [55], хлороформ – пропанол-2 (9:1) [56, 57], хлороформ – пропанол-2 – н-гептан (60:14:26) [58], н-бутилхлорид [47], метилбутиловый эфир – н-гексан (75:25) [41], гексан – дихлорметан (30:40) [59], дихлорметан – пропанол-2 (9:1) [60], этилацетат [61], этилацетат – н-гексан (3:1) [48], этилацетат – гептан (4:1) [62], н-бутилацетат [29, 63], метиленхлорид [15], толуол [64].

Твёрдофазная экстракция была применена для извлечения Z-препаратов и их метаболитов из жидких образцов с использованием колонок и дисков, содержащих различные сорбенты: Lichrolut TSC, элюент: дихлорметан – ацетон (4:1) [50]; картридж C18, элюент: дихлорметан (8:2) [65]; Extrelut NT, элюент: дихлорметан – пропанол-2 (85:15) [66]; Silica SPE, элюент: метанол – ацетонитрил (60:40) [64]; диски SPEC C18 и SPEC MP3, элюент: дихлорэтан – пропанол-2 – 25% раствор гидроксида аммония (80:20:2) [40, 67].

Выделение залеплона, золпидема и зопиклона из тканей внутренних органов и волос авторы работ проводили путём экстрагирования веществ с использованием гидрофильных, липофильных и амфифильных растворителей. Для этой цели были использованы вода, подкисленная щавелевой или серной кислотой [15, 55], фосфатный [65] и боратный [66] буферные растворы, хлороформ [68], н-бутилхлорид [47], диэтиловый эфир – метиленхлорид (1:1) [25], диэтиловый эфир – этилацетат (1:1) [11], метанол [26,49], этанол, подкисленный щавелевой кислотой [55], ацетонитрил [18, 69], ацетон [53, 70–73] и некоторые другие экстрагенты.

Идентификацию и количественное определение залеплона, золпидема и зопиклона, выделенных из биологических образцов, исследователи выполняли с помощью физико-химических методов. Для этой цели были использованы методы ВЭЖХ, ЖХ-МС-МС, ГХ-МС, капиллярного электрофореза, как более экспрессные и чувствительные, позволяющие разделять смеси Z-препаратов, их метаболитов и других психотропных веществ, идентифицировать и определять их количественное содержание. Наиболее часто для этих целей применялся метод ВЭЖХ в разных модификациях с использованием различных стационарных и мобильных фаз, разных систем детектирования и условий анализа [18, 28, 41, 46, 47, 50, 51, 59, 62, 68, 74–79].

Разделение и анализ залеплона, золпидема, зопиклона и эсзопиклона методами ВЭЖХ авторы проводили на колонках Varian Pursuit 3 C18 [22], BDS Hypersil phenyl [62], LiChrospher 60 RP-Select-B [58], Separon C18 [18], Waters Atlantis dC18 [62], Nova Pak C18 [58], Superspher 60 RP Select B [11], Phenomex Kinetex [46], Hypersil GOLD PFP [80], Hypersil BDS C18 [41], Spherisorb ODS-2 [60], Bondapack C18 [49], OD-5-100 C18 [81], AC QUITY UPLC BEH C18 [69], Supelcosil C8 [82] и др.

В качестве подвижных фаз, как правило, использовались смеси буферных растворов с ацетонитрилом или метанолом, например 5 мМ аммоний – буферный раствор (pH 3,5) – метанол [46], формиатный буфер (pH 3,0) – ацетонитрил [76, 78], 25 мМ триэтиламмоний-фосфатный буферный раствор (pH 3) – ацетонитрил [50], 40% фосфатный буфер в ацетонитриле [47], смесь 1,5 М раствора ацетата аммония, ацетонитрила, метанола и воды (раствор А – 3:10:10:77, раствор В – 3:40:40:17) [41], ацетонитрил – этанол – метанол (6:2:2) [65], раствор фосфата натрия – метанол (4,5:5,5) [60], ацетонитрил – 5 М раствор ацетата аммония (pH 5) [62], смеси метанола и воды [83], смесь 20 мМ раствора ацетата натрия и 0,2% раствора муравьиной кислоты – ацетонитрил (75:25) [6], 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (35:65) [69], метанол – тетрагидрофуран–фосфатный буфер pH 2,6 [58] и др.

Детектирование исследуемых веществ осуществлялось чаще всего с помощью масс-селективных детекторов [46, 47, 50, 51, 62, 65, 68, 75, 76, 79, 84, 85], а также УФ-детекторов [47, 50, 75, 86] и детекторов по флюоресценции [59, 60, 77, 78, 82, 87]. Кроме того, применялись методы ВЭЖХ-МС/МС и УВЭЖХ-МС/МС с применением следующего оборудования: системы жидкостной хроматографии – триплетной квадрупольной масс-спектрометрии [78], ультраэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии Waters Xevo TQ-S (MS-MS) [69] и Waters AQUITY UPLC [88], Agilent RapidFire-MS-MS-системы [45], Waters Quattro Ultima Pt-тандемной масс-спектрометрии [62], технологии LC-MS-MS с программным обеспечением ACD/Chrom LC Simulator [23].

Для определения в биологических объектах залеплона, золпидема зопиклона и их метаболитов применялись также методы газовой хроматографии с использованием разных условий анализа и систем детектирования. Как правило, исследования проводились с использованием капиллярных колонок: DB-5 MS [41], DB-5 и DB17 [41, 89], Rtx-IMS [66], Silica Ultra 2 [90], Restek RXi-5MS [91] и др.

Детектирование исследуемых веществ чаще всего осуществлялось с помощью масс-селективных детекторов [15, 16, 18, 33, 45, 46, 50, 54, 57, 61, 66], масс-анализатора с ионной ловушкой [41], а также азотно-фосфорных [63, 92, 93] и термоионного [74] детекторов. Кроме того, в ряде работ были использованы приборы с двумя детекторами, например азотно-фосфорный и электронного захвата [90], ионизации пламени и масс-селективный [50], ионизации пламени и электронного захвата [29], масс-селективный и электронного захвата [64], азотно-фосфорный и масс-селективный [94]. В указанных случаях один детектор чаще всего использовался для идентификации исследуемых веществ, другой – для количественного определения.



Waters Xevo TQ-S

Сравнительно реже для анализа залеплона, золпидема и зопиклона, выделенных из биологического материала, использовался метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Метод применялся главным образом для обнаружения исследуемых веществ на хроматограммах, а также с целью очистки, предварительной идентификации и препаративного выделения [15, 18, 29, 34, 53, 55, 68, 70, 84, 95, 96]. Детектирование веществ проводили по флюоресценции после воздействия УФ-излучения с помощью реактивов Драгендорфа, йодплатината калия, прочного черного К и др.

УФ-спектрофотометрическому методу анализа залеплона, золпидема и зопиклона, выделенных из биологических объектов, посвящено значительно меньше работ по сравнению с хроматографическими методами [15, 29, 34, 53, 55, 68, 71, 72, 84, 96]. Чаще всего метод применялся вкупе с другими методами для идентификации и количественного определения с использованием характерных спектров Z-препаратов и величины абсорбции веществ в максимумах поглощения.

С целью выполнения иммуноферментного анализа залеплона и золпидема и их основных метаболитов получены высокочувствительные поликлональные антитела, которые могут быть использованы в токсикологических, судебно-медицинских и клинических исследованиях [97]. Для определения золпидема в моче пациентов использован иммуноферментный метод [91], результаты которого не отличались от данных, полученных ме-



Waters AQUITY UPLC

тодом ГХ-МС. Методы радиоиммуного анализа [98] и поляризационного флюроиммуноанализа [99] были применены для определения N-дезметилзопиклона в моче как показателя употребления нативного вещества.

Капиллярный электрофорез с детектором по флюоресценции, индуцированной He-Cd-УФ-лазером, авторы [56] применили для определения зопиклона и его энантиомеров в моче и слюне волонтёров. Те же авторы [100] с помощью капиллярного электрофореза разделили золпидем и его метаболиты, выделенные из мочи. По мнению исследователей, метод капиллярного электрофореза по сравнению с ВЭЖХ является более простым и экспрессным.

В ряде работ изложены методики по одновременному исследованию в биологических матрицах смесей трёх или двух анализируемых веществ. Приводим некоторые из них.

Метод жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС-МС) использован для определения трёх Z-лекарств и 21 препарата из группы бензодиазепина в волосах людей [26]. После экстракции веществ метанолом или смесью метанола и воды для их разделения были применены две дифференциальные ВЭЖХ-МС-системы с ионизацией электрораспылением, колонка Phenomenex Kinetex, мобильная фаза – 5 мМ аммоний – боратный буфер (pH 3,5) – метанол, скорость потока – 0,75 мл/мин, пределы количественного определения – 0,6–16 пг в 1 мг волос.

Залеплон, золпидем, зопиклон и 17 производных бензодиазепина были разделены и определены в слюне методом ЖХ-МС/МС после экстракции веществ из 0,5 мл образца 3 мл смеси диэтилового эфира с метиленхлоридом (50:50) при pH 8,4 [25]: предел количественного определения – 0,1–0,2 нг/мл, линейность соблюдалась до 20 нг/мл, коэффициент вариации для всех веществ лежал в пределах 4–8%, кроме зопиклона (34%), выход веществ был не ниже 90%.

M.K. Bjork с соавт. [22] разработали метод ВЭЖХ-МС-МС для определения в цельной крови 19 наркотических средств, их метаболитов и трёх Z-препаратов: прибор Agilent HPLC 1100, MC/MC (Waters Quattro), колонка Varian Pursuit 3 C18, градиентный режим, продолжительность анализа – 35 мин, предел количественного определения – 0,5–10 мкг/кг, выход для всех аналитов составлял 34–97%, кроме залеплона (6%). Метод был успешно применён в 412 судебно-медицинских случаях, из которых 267 были связаны с нарушениями правил уличного движения.

C. Kratzsch с соавт. [11] описали применение метода жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии с химической ионизацией при атмосферном давлении для анализа залеплона, золпидема, зопиклона и 23 производных бензодиазепина и флумазенила. Аналиты выделяли из плазмы крови с помощью экстракции смесью диэтилового эфира и этилацетата (1:1) в при-



Agilent 1260 Infinity

сутствии насыщенного раствора сульфата натрия. После отделения органической фазы экстракцию повторяли из щелочной среды. Разделение и определение исследуемых веществ в градиентном режиме выполняли, используя в качестве стационарной фазы Superspher 60 RP Select B, подвижной фазы – смесь водного раствора формиата аммония с добавлением муравьиной кислоты до pH 3 (элюент 1) и ацетонитрила (элюент 2), внутренних стандартов – три дейтерированных бензодиазепина и тримипрамин-d3. В результате исследований найдено, что линейность при определении залеплона наблюдалась в пределах 0,005–0,125 мг/л, золпидема – 0,04–0,5 мг/л и зопиклона – 0,005–0,188 мг/л, выход исследуемых веществ соответственно был равен 109,8%, 104,1% и 99,7%. Методика была апробирована на образцах плазмы пациентов и рекомендована для изолирования, разделения, скрининга, идентификации и количественного определения указанных лекарственных веществ в клинической и судебной токсикологии.

Экспрессный с высоким разрешением метод жидкостной хроматографии – триплетной квадрупольной масс-спектрометрии (RRLC/QqQ-MS) был разработан авторами [80] для количественного определения 34 производных бензодиазепина, их метаболитов и трёх Z-препаратов в моче. Одновременному хроматографическому разделению и определению исследуемых веществ подвергали разбавленную в 10 раз мочу без стадии экстракции. Был использован прибор Agilent 1200 серии RRLC с предколонкой (Zorbax SB-C8) и колонкой (Hypersil GOLD PFP); мобильная фаза состояла из двух растворителей: воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты и 1 мМ аммония формиата, и ацетонитрила, также содержащего 0,1% муравьиной кислоты и 1 мМ

аммония формиата, режим – градиентный, скорость потока – 0,3 мл/мин, внутренние стандарты – дейтерированные золпидем-d6 и празепам-d5, продолжительность анализа составляла 17 мин, выход для всех веществ был равен 80,2–98,5%, предел количественного определения – от 0,01 до 0,5 нг/мл, линейность при определении залеплона, золпидема и зопиклона соблюдалась в диапазоне концентраций 0,1–500,0 нг, 5,0–500,0 нг и 0,1–250,0 нг в 1 мл мочи соответственно. Авторы показали, что, несмотря на отсутствие стадии пробоподготовки (только разведение мочи), матричный эффект был незначительным. Предложенный метод валидирован и рекомендован для применения в клинической практике.

Разработан ультрабыстрый и точный метод анализа Z-лекарств в моче с помощью системы Agilent RapidFire/MS/MS [28]: продолжительность анализа – 15 с, линейность – 5–500 нг/мл, внутренние стандарты – дейтерированные золпидем-d6 и зопиклон-d4. Полученные результаты не отличались от результатов, выполненных методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии.

В работе авторов [101] приведены результаты определения залеплона, золпидема и зопиклона в биологических образцах крыс после острого комбинированного отравления животных смесью указанных препаратов. Исследования проводили по разработанной авторами методике, основанной на изолировании веществ с помощью ацетона, экстракционной и хроматографической очистке, идентификации методами ТСХ-скрининга, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ и количественном определении спектрофотометрическим методом. В результате Z-препараты были выделены из ткани печени, почек, крови, легких, разделены, идентифицированы и количественно определены.

Определение золпидема, зопиклона, ряда наркотических средств и их метаболитов в слюне (всего 32 вещества) методом ЖХ-МС/МС описано в работе [62]: 0,5 мл слюны смешивали с 50 мкл раствора внутренних стандартов (некоторые дейтерированные производные исследуемых веществ) и 250 мкл аммоний-карбонатного буферного раствора с pH 9,3. Аналиты экстрагировали 1,3 мл смеси этилацетат – гептан (4:1), органическую фазу выпаривали при 40°С под током азота, остаток растворяли в 60 мкл смеси ацетонитрил – вода (10:90). Для разделения и определения использовали систему Waters Quattro Ultima Pt – тандемную масс-спектрометрию: колонка Waters Atlantis dC18, ионизация электрораспылением, подвижная фаза – ацетонитрил (растворитель 1) и 5 М раствор ацетата аммония pH 5 (растворитель 2), градиентный режим, скорость потока – 0,3 мл/мин, линейность при определении зопиклона наблюдалась в пределах 0,005–0,05 мкмоль/л, выход в среднем был равен 65%, предел определения – 0,97 мкг/л.

Простой, специфичный и селективный метод разделения золпидема и зопиклона в плазме осуществлён с помощью газовой хроматографии с азотно-фосфорным детектированием [93]. Метод является чувствительным (предел обнаружения золпидема – 1 нг/мл, зопиклона – 2 нг/мл) и может быть использован для изучения фармакокинетики исследуемых веществ, а также в токсикологии.

С помощью метода жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии авторы [79] выполнили одновременное определение 26 веществ, производных бензодиазепина, их метаболитов, золпидема и зопиклона в крови, моче и волосах. Исследуемые образцы были собраны у добровольцев, не принимавших лекарств, водителей при автодорожном контроле, а также у лиц в криминальных случаях. В качестве внутренних стандартов использовали дейтерированные производные бензодиазепинов. Образцы мочи подвергали предварительному ферментативному гидролизу с использованием β-глюкуронидазы в среде ацетатного буфера (pH 4,6) в течение 1 ч при 56 °С. Волосы вначале обрабатывали дважды дихлорметаном, по одному разу водой и метанолом и в течение 15 мин воздействовали ультразвуком. 20 мг волос измельчали до порошкообразного состояния, инкубировали при встряхивании с 1 мл метанола при 45 °С в течение 2 ч, центрифугировали, супернатант концентрировали и исследовали.

A.W. Jones и A. Holmagren [63] в течение 10 лет определяли золпидем и зопиклон в периферической крови живых субъектов (водителей, нарушивших правила дорожного движения) и трупов лиц, погибших от разных причин, используя судебно-медицинские материалы. Образцы экстрагировали с помощью н-бутилацетата и исследовали методом ГХ с азотно-фосфорным детектором. В результате показано, что в случае смерти от отравлений концентрация в крови золпидема была выше (0,30 мг/л) по сравнению с другими причинами смерти (0,13 мг/л) и с живыми лицами (0,19 мг/л). В случаях смертельных отравлений, когда в крови не было обнаружено других веществ, кроме золпидема, его концентрация была равна 1,35 мг/л. Предел определения зопиклона в крови был равен 0,02 мг/л, средняя посмертная концентрация составляла 0,20 мг/л и была значительно выше (0,70 мг/л), если причиной смерти был только зопиклон, по сравнению с концентрациями при комбинированных отравлениях (0,06–0,07 мг/л).

K.W. Simonson и др. [88] разработали метод ультраэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектроскопии (система Waters AQUITY UPLC) для скрининга и определения залеплона, зопиклона и 23 производных бензодиазепина в цельной крови живых лиц и трупов: минимально определяемые концентрации веществ были равны 0,002–0,005 мг/кг, выход лежал в пределах 73–108%.

Авторы [58] описали методику выделения из плазмы крови, разделения и обнаружения зопиклона, золпидема, суриклона и алпидема. Экстракцию осу-

ществляли с помощью смеси растворителей – хлороформ – прапонол-2 – н-гептан (60:14:26), для разделения и идентификации использовали метод ВЭЖХ: колонка Nova-Pac C18, подвижная фаза: метанол – тетрагидрофуран – фосфатный буфер (pH 2) (65:5:30), детектор – диодная матрица.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в представленном обзоре отечественной и зарубежной специальной литературы приведены данные по определению залеплона, золпидема и зопиклона в биологических объектах. Идентификация и определение указанных веществ в крови, моче, тканях внутренних органов и других биологических образцах имеет важное значение для решения многих задач, в том числе связанных с диагностикой и лечением отравлений. Для выделения Z-препаратов из объектов исследования авторы работ использовали экстракционные методы, а с целью обнаружения и определения количественного содержания веществ и их метаболитов чаще всего принимали высокочувствительные и специфичные методы анализа – ВЭЖХ и ГЖХ с использованием современных систем детектирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Н. Дадашева. Применение препарата анданте (залеплона) при кратковременной инсомнии // Неврологич. журн. 2008. № 6. С. 49–51.
2. М.Н. Дадашева. Лечение инсомний препаратом залеплон // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. Т. 108. № 7. С. 82–83.
3. АНД 42-13 662-05. Анданте, капсулы 5 мг и 10 мг. Инструкция по применению лекарственного препарата / «Гедеон Рихтер АОА». – Будапешт. 2008. 2 с.
4. ЛРС-009924/08- 111208. Залеплон (субстанция-порошок). Введ. 14.10.2000. – М.: МЗ РФ, Фармакопейный гос. ком., 2002. 10 с.
5. Залеплон.URL:htpp://smed.ru/guides/72975/?bukva=%C7&search_type=alf (дата обращения 20.12.2017).
6. Non benzodiazepine // Wikis. Wikipedia. URL: http:/www.thefullwiki.orgNonbenzodiazepine (дата обращения 20.12.2017).
7. Sonata (zaleplon) Capsules. URL: http://www.rxlist.com/sonata-drug.htm (дата обращения 20.12.2017).
8. Zaleplon. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Zaleplon?action=history (дата обращения 20.12.2017).
9. Снотворное повышает риск развития болезни Альцгеймера // Медицинский вестник. URL: http://www.medvestnik.by/ru/issues/n_8079.html (дата обращения 20.12.2017).
10. M.G. Terzano et al. New Drugs for Insomnia. Comparative Tolerability of Zopiclone, Zolpidem and Zaleplon // Drug Safety. 2003. V. 26, N 4. P. 261–282.
11. C. Kratzsch et al. Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumasenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass-spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization // J. Mass Spectrometr. 2004. V. 39. № 8. P. 856–872.
12. C. Victorri-Vigneau, E. Dailly. Evidence of zolpidem abuse and depedence: results of the French Centre for Evaluation and Information on Pharmacodepedence (CEIP) network survey // Br. J. Clin. Pharmacol. 2007. V. 64. № 2. P. 198–209.
13. ФС 42-11888-01. Золпидема тартрат (субстанция). Введ. 26.09.2001. – М.: МЗ РФ, Фармакопейный гос. ком., 2002. 8 с.
14. EP 992-93-6. Zolpidem Tartrate (Zolpidemi tartars) (anhydrous substance). – Washington. 2005. 3 p.
15. Е.И Егорова. Исследование золпидема в химико-токсикологическом отношении: автореф. дис. … к.фарм.н. – Пермь. 2011. 24 с.
16. T.P Rohrig, C.M Moore. Zolpidem. Forensic Aspects Toxicol // Patolog. 2005. V. 1, № 2. P. 81–90.
17. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2012. 1215 с.
18. Р.Р. Краснова и др. Химико-токсикологический анализ имована в биологических объектах // Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской науки и практики: материалы 4 Всерос. съезда судеб. медиков. – Пермь. 2005. С. 163–164.
19. EP 43200-80-2. Zopiclone (Zopiclonum). – Washington. 2003. 2 p.
20. ФСП 42-0341404803. Зопиклон таблетки 0,0075 г. Введ. 01.06.2004. – М.: МЗ РФ, Фармакопейный гос. ком., 2004. 12 с.
21. Медицинский справочник: Z-препараты в лечении инсомнии // Медицинский справочник. URL: http://doctorpb.ru/articles.php?article_id=1522 (дата обращения 20.12.2017).
22. M.K. Bjork et al. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2010. V. 396. № 7. P. 2393–2401.
23. M.J. Meng et al. Fast chiral chromatographic method and validation for the quantitation of eszopiclone in human using LC-MS/MS // J. pharmac. biomed. Analysis. 2010. V. 53. № 4. P. 973–982.
24. O. Schulz. Die Bedeutung der neueren Hypno-Sedativa Zopiclon und Zolpidem im klinisch-toxicologischen Untersuchungsgut unter besonderer Berucksichtigung der klassischen Benzodiazepine: dis. … .dokt. medizin. – Hamburg. 2009. 90 p.
25. P. Kintz, M. Villain, M. Concheiro, V. Cirimeli. Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS // Forensic Sci Int. 2005. V. 150. № 2/3. P. 213–220.
26. K.Y. Rust, M.R. Baumgartner, N. Meggiolaro, T. Kramer. Detection and validatet quantification of 21 benzodiazepines and 3 "z-drugs" in human hair by LC-MS/MS // Forensic Sci Int. 2012. V. 215. № 1/3. P. 64–72.
27. N. Gunja. The Clinical and Forensic Toxicolgy of Z-drugs // J. Med Toxicol. 2013. V. 9. № 2. P. 155–162.
28. M. Joussef, V.P. Miller. Ultrafast Analysis of Z-Drugs in Urine Using the Agilent RapidFire High-Throunghput Mass Spectrometry System. URL: www.agilent.com/lifesciences/rapidfire (дата обращения 20.12.2017).
29. L. Khodasevich. Acute poisoning by new psychotropic substance Zopiclone. URL: http://www.medline.ru/monograf /sudmed/a2/5tsast-1.shtml (дата обращения 20.12.2017).
30. E.K. Stranks, S.F. Crowe. The acute cognitive effects of zopiclone, zolpidem, zaleplon, and eszopiclone: a systematic review and meta-analysis // J. Clin Exp Neuropsychol. 2014. V. 36. № 7. P. 691–700.
31. M.A. Tonon, P.S. Bonato. Metods for the analysis of nonbezodiazepine hypnotic drugs in biological matrices // Summ. Bioanalysis. 2012. V. 4. № 3. P. 291–304.

32. Z-drug: a review of the evidence of misuse and harm. Advisory Council on the Misuse of Drugs. – London. 2013. 29 p.

33. Е.А. Крылова, Ю.А. Хомов. Фармакокинетика и биотрансформация золпидема: анализ главных метаболитов // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2. URL: www.science-education.ru/108-8576 (дата обращения 20.12.2017).

34. Ю.А. Хомов, Е.А. Крылова, Е.И. Егорова. Изолирование, обнаружение и количественное определение золпидема в биологических жидкостях // Современ. проблемы науки и образования. 2012. № 2.URL: www.science-education.ru/102-5868 (дата обращения 20.12.2017).

35. D.R. Drover. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of short-acting hypnosedatives: zaleplon, zolpidem and zopiclone // Clin Pharmacokinet. 2004. V. 43. № 4. P. 227–238.

36. N. Gunja. The Effects of Z-drugs on Performance and Driving // J. Med Toxicol. 2013. V. 9. № 2. P. 163–171.

37. M. Heydari, M.S. Isfeedvajani Zolpidem dependence, abuse and withdrawal: A case report // J. Res. Med Sci. 2013. V. 18. P. 1006–1007.

38. M.A. Paul, G. Gray, G. Kenny, R.A. Pigeau. Impact of mlatonin, zaleplone and temazepam om pshychomotor performance // Aviat Space Environ Med. 2003. V. 74. № 12. P. 1263–1270.

39. A. Patat, I. Paty, I. Hindmarsh. Pharmacodynamic profile of Zaleplon, a new non benzodiazepine hypnotic agent // Human Psychopharmacol. 2001. V. 16. № 5. P. 369–392.

40. Е.А. Шилова и др. Исследование экстракции золпидема из водных растворов // Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств: материалы российской науч.-практич. конф., посвященной 70-летию ПГФА. – Пермь. 2007. С. 236–241.

41. J. Van Bocxlaer et al. Analisis of Zopiclone (Imovane) in Posmortem Specimens by GC-MS and HPLC with Diode-Array Detection // J. Analyt Toxicol. 1996. V. 20. № 1. P. 52–54.

42. M.A. Tonon, P.S Bonato. Capillary electrophoretic enantiselective determination of zopiclone and its impurities // Electrophoresis. 2012. V. 33. P. 1606–1612.

43. A. Sawsan et al. Development of Stability Indicating Densitometric and Enhanced Sensitivity Spectrofluorimetric Methods for Determination of Zaleplon in Presence of its Acid Degradation Products // Pharm. Anal. Acta. 2013. V. 4. № 6. P. 256–262.

44. N.A. Buckley, P.R. McManus. Changes in fatalities due to overdose of anxiolytic and sedative drugs in the UK (1`983-1999) // Drug Saf. 2004. V. 27. № 2. P. 135.

45. Е.А. Крылова. Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии при анализе золпидема и его метаболитов в биологических жидкостях для экспертных целей: автореф. дис. … к.фарм.н. – Пермь. 2013. 25 с.

46. Е.А. Крылова. Способ доказательства метаболитов золпидема в моче // Здоровье и образование в XXI веке: материалы 12 междунар. конгр. – М.: РУДН, 2011. С. 254–259.

47. P.J. Boniface, S.G.G. Russel. Two Cases of Fatal Zopiclone Overdose // J. Analyt. Toxicol. 1996. V. 20. P. 131–133.

48. X. Cui, P. Xiang, J.J. Zhang. Segmental Hair Analysis after a Single Dose of Zolpidem: Cmparison with a Previous Study // Toxicol. 2013. V. 37. № 6. P. 369–375.

49. B.A. El Zeany, A.A. Moustafa, N.F. Farid. Determination of zolpidem hemitartrate by quantitative HPTLC and LC // J. pharmac. biomed. Analysis. 2003. V. 33. № 3. P. 393–401.

50. E. Mannaert, J. Tytgat, P. Daenens. Detection of 2-Amino-5-Chlorpyridene in Urine as a Parameter of Zopiclone (Imovane) Intake using HPLC with Diode Array Detection // J. Analyt. Toxicol. 1997. № 3. P. 208–212.

51. L. Pichard et al. Oxidative metabolism of zolpidem by human liver cytochrome P 450 S // Drug Mtabol. Dispos. 1995. V. 23. № 11. P. 1253–1262.

52. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Изолирование и определение золпидема, залеплона и зопиклона при исследовании мочи // Современные проблемы гуманитарных и естественных наук: материалы XX междунар. науч.-практ. конф. – М. 2014. С. 297–302.

53. Г.П Чепурная. Химико-токсикологическое исследование залеплона и других Z-препаратов: автореф. дис. … к.фарм.н. – Пятигорск. 2016. 24 с.

54. С.С. Катаев и др. Хромато-масс-спектрометрическое определение зопиклона в моче // Журн. аналитич. химии. 2007. Т. 62. № 5. С. 510–514.

55. М.Г. Мусина, В.В. Килин, А.А. Мингазов. Смертельное отравление залеплоном // Проблемы экспертизы в медицине. 2010. № 1/2. С. 45–46.

56. G. Hempel, G.J. Blaschke. Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites by capillary electrophoresis // Chromatogr. B. 1996. V. 675. № 1. P. 139–146.

57. J.H. Levis, J.H. Vine. A simple and rapid method for the identification of zolpidem carboxylic acid in urine // J. Analytic. Toxicol. 2007. V. 5. № 1. P. 72–78.

58. A. Tracqui, P. Kintz, P. Mangin. High-performance liquid chromatography assay with diode-array detection for toxicological screenibg of zopiclone, zolpidem, suriclone and alpidem in human plasma // J. Chromatog. B. 1993. V. 616. № 1. P. 95–103.

59. J.G. Bramness et al. Fatal Overdose of Zopiclone in an Elderly Woman with Bronchogenic Carcinoma // J. Forensic Sci. 2001. V. 46. № 5. P. 1247–1249.

60. A. Le Liboux, A. Frydman, J. Gaillot. Simultaneous determination of zopiclone and two major metabolites (N-oxide and N-desmethyl in human biological fluids by reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 1987. V. 417. P. 151–158.

61. Eszopiclone. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Eszopiclone (дата обращения 20.12.2017).

62. E.L. Oistad, U. Johansen, A.S. Christophersen. Drug Screening of Preserved Oral Fluid by Liquid Chromatography-Tandem Mass-Spectrometry // Clin. Chem. 2007. V. 53, № 2. P. 300–309.

63. A.W. Jonas, A. Holgrem. Concentrations of zolpidem and zopiclone in venous blood samples from impaired drivers compared with femoral blood forensic autopsies // Forensic Sci Intern. 2012. V. 222. № 1. P. 118–123.

64. D.T. Anderson, R.D. Budd. Zaleplon (Sonata) Analysis in Postmortem Specimens by Gas Chromatography-Electron Capture Detection // J. Analyt. Toxicol. 2009. V. 33. № 8. P. 481–485.

65. M. Kuntze, A.H. Bullenger, F. Mutller-Spabn. Excessive use of zopiclone: a case report // Swiss Med Wkly. 2002. V. 132. P. 523.

66. T. Takayasu, Y. Ishiada, A. Kimura. Distribution of zolpidem in bodi fluids and organ tissues in five autopsy cases // Forensic Toxicol. 2008. V. 26. № 2. P. 80–84.

67. Е.А. Шилова и др. Изолирование золпидема и его основного метаболита методом твёрдофазной экстракции // Проблемы экспертизы в медицине. 2008. Т. 8. № 1(29). С. 37–40.

68. Л.Ю. Клименко. Хіміко-токсикологічне дослідження зопіклону: автореф. дис. … к.фарм.н. – Киев. 2007. 26 с.

69. K.S. Thomson, R.J. Lewis, R.M Ritter. Analysis of Zolpidemin Postmortem Fluids and Tissues Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-MassSpectrometry. – Washington. 2014. P. 1–11.

70. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Определение зопиклона, золпидема и залеплона в ткани печени // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сб. материалов 5-й междунар. науч.-практ. телеконф. – Белгород. 2015. С. 187–191.

71. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Определение золпидема в биологических объектах лабораторных животных // Эффективность исследования современности: материалы X междунар.науч. конф. – М. 2015. № 10. Ч. 1. С. 77–79.

72. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Изучение сохраняемости золпидема и залеплона в ткани печени // Судебно-медицинская экспертиза. 2015. № 4. С. 26–28.

73. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Изолирование и определение Z-препаратов в трупной ткани желудка и кишечника // Инновационные технологии в фармации: сб. науч. тр. – Иркутск. 2016. Вып. 3. С. 174–180.

74. D. Debruyne, J. Lacotte, B.H. Ligny, M. Moilin. Determination of zolpidem and zopiclon in serum by capillary column gas chromatography // J. Pharmac. Sci. 1991. V. 80. № 1. P. 71–74.

75. M.J. Royer-Morrot et al. Determination of zopiclone in plasma using column liquid chromatography with ultraviolet detection // J. Chromatog. B: Biomed. Sci. Application. 1992. V. 581. № 2. P. 297–299.

76. S.R. Dhaneshwar, V.K. Bhusari. Development of Valedated Stability-Indicating HPLC assay method for Eszopiclone // Inter. J. Chem Tech Res. 2011. V. 3. № 2. P. 680.

77. E. Mannaert, J. Tutgat, P. Daenens. Detection and quantification of the hypnotic zopiclone, connected with an uncommon case of drowning // Forensic Sci Int. 1996. V. 83. № 1. P. 67–72.

78. R.V.S. Nirogi et al. Quantification of zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // Biomed. Chromatogr. 2006. V. 20. № 10. P. 1103–1108.

79. M. Laloup et al. Validation of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of 26 Benzodiazepines and Metabolites, Zolpidem and Zopiclon, in Blood, Urine, and Hair // J. Analyt. Toxicol. 2005. V. 29. № 7. P. 616–626.

80. D.R Drover. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of short-acting hypnosedatives: zaleplon, zolpidem and zopiclone // Clin Pharmacokinet. 2004. V. 43. № 4. P. 227–238.

81. Q. Wang, L. Sun, C.E. Lau. Determination of zolpidem in serum microsamples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. // J. Chromatog B. 1999. V. 734. № 2. P. 299–305.

82. Deng Ming et al. Determination of Zaleplon in Human Plasma by RP-HPLC with Fluorescence // Chinese J. Pharmac. Anal. 2004. V. 24. № 6. P. 611–613.

83. S. Sessia. Analytical profile of zolpidem // Boll SocItalSper. 1994. V. 70. № 5/6. P. 151–157.

84. Н.И. Запольская. К вопросу об идентификации имована. // Теория и практика судебной медицины: тр. Петербург. науч. общества судеб. медиков. 2002. Вып. 6. С. 94–96.

85. R.C. Irving, S.J. Dikson. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS // Forensic Sci Int. 2007. V. 166. № 1. P. 58–67.

86. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова и др. Применение метода ВЭЖХ для анализа некоторых антипсихотических и снотворных лекарственных средств, выделенных из биологических объектов // Актуальные проблемы управления здоровьем населения: сб. науч. тр. – Нижний Новгород. 2015. Вып. VIII. С. 178–182.

87. R.N. El-Shaheny, A. Alattas, J.J. Nasr. Simultaneous determination of zopiclone and its degradation product and main impurity (2-amino-5-chlorpyridine) by micellar liquid chromatography with time-programmed fluorescence detection: Preliminary investigation for biological monitoring // J. Chromatog. B. 2012. V. 907. P. 49–55.

88. K.W. Simonsen et al. A validated method for simultaneous screening and quantification of twenty-three benzodiazepines and metabolites plus zopiclone and zaleplone in whole blood by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem spectrometry // J. Analyt. Topxicol. 2010. V. 34. № 6. P. 332–341.

89. S.B. Gock et al. Acute zolpidem overdose – report of two cases // J Anal Toxicol. 1999. V. 23. P. 559–562.

90. Y. Gaillard, J. Gay-Montchamp, M.J. Ollagnier. Similtaneous screening and quantitation of zolpidem, buspirone and benzodiazepines by dual-channel gas chromatography using electron-capture and nitrogen-phosphorus detection after solid-phase extraction // Chromatog. B. 1993. V. 622. № 2. P. 197–208.

91. L. Reidy et al. Zolpidem Urine Excretion Profiles and Cross-Reactivity with ELISA Kits in Subjects Using Zolpidem or Ambien CR a Prescription Seep Aid // J. Analyt. Toxicol. 2011. V. 35. P. 294–301.

92. T.P. Rohrig, L.A. Harriman, M.C. Norton. Identification and Quantitation of Zolpidem in Biological Matrices Using Gas Chromatography-MassSpectrometry (GC-MS) // Clinic. Applic. Mass Spectrometry. 2010. V. 603. P. 519–526.

93. F. Stanke, N. Jourdil, J. Bessard, G. Bessard. Simultaneous determination of zolpidem and zopiclon in human plasma by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection // J. Chromatog. B. 1996. V. 675. № 1. P. 43–51.

94. B. Levine, S.C. Wu, J.E. Smialek. Zolpidem distribution in postmortem cases // J. Forensic Sci. 1999. V. 44. № 2. P. 369–371.

95. Е.А. Крылова, Б. Харири. Определение золпидема в образцах мочи при различных сроках хранения // Вестн. Пермск. гос. фармац. акад. 2012. № 9. С. 141–142.

96. Ю.А. Хомов, Н.В. Кокшарова, М. Дайех, В.П. Гаранин. Химико-токсикологический анализ имована // Проблемы экспертизы в медицине. 2004. № 1. С. 96–97.

97. M.E. Benchikh et al. Development of sensitive polyclonal antibodies for the detection of zaleplon and zolpidem. URL: www.randox-lifesciences.com/Zaleplon%20Zolpidem%20(polyclonal) (дата обращения 20.12.2017).

98. E. Mannaert, P. Daenens. Development of radioimmunoassay for the determination of *N*-desmetylzopiclone in urine // Analyst. 1994. V. 119. P. 2221–2226.

99. E. Mannaert, P. Daenens. Development of fluorescence polarization immunoassay for the routine detection of N-desmetylzopiclone in urine samples // Analyst. 1996. V. 121. P. 857–861.

100. G. Hempel, G. Blaschke. Direct determination of zolpidem and its metabolites in urine using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection // J. Chromatogr. B. 1996. V. 675. P. 131–137.

101. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Определение Z-препаратов в биологических объектах лабораторных животных // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фарм. фак-та. – Курск. 2016. Т. 3. С. 127–132.

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



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

Забронируйте стенд
pharmtech-expo.ru

УДК 615.458

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОТЕЧЕСТВЕННОГО И ЗАРУБЕЖНОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РЫНКОВ СПРЕЕВ ДЛЯ НОСА С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА ПЕРСПЕКТИВ ДАЛЬНЕЙШЕЙ ИХ РАЗРАБОТКИ

М.Ю. Кинев[1]*, А.Ю. Петров[1]

Резюме. Представлены результаты сравнительного анализа номенклатуры ассортимента назальных спреев на фармацевтических рынках Российской Федерации и США. Ассортимент назальных спреев фармацевтического рынка РФ представлен 122 торговыми наименованиями, 30 международными непатентованными наименованиями, 14 фармакотерапевтическими группами, 11 АТХ-группами, 21 странами-производителями. На фармацевтическом рынке США назальные спреи представлены 12 АТХ-группами, среди которых наибольший удельный вес занимает группа «R01A Деконгестанты». Определены 4 направления разработки назальных спреев для отечественной фармацевтической отрасли: 1) разработка спреев, которые представлены на фармацевтическом рынке США; 2) разработка спреев, которые отсутствуют на отечественном и зарубежном фармацевтических рынках; 3) разработка спреев, которые представлены другими лекарственными формами; 4) разработка спреев аптечного изготовления.

Ключевые слова: назальные спреи, фармацевтический рынок, ассортимент, перспективы разработки.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DOMESTIC AND FOREIGN PHARMACEUTICAL MARKETS FOR THE NOSE WITH THE PURPOSE OF SEARCHING FOR FUTURE DEVELOPMENT PROSPECTS

M.Yu. Kinev[1], A.Yu. Petrov[1]

Abstract. The results of a comparative analysis of the nomenclature of the assortment of nasal sprays in the pharmaceutical markets of the Russian Federation and the USA are presented. The assortment of nasal sprays of the Russian pharmaceutical market is represented by 122 trade names, 30 international non-proprietary names, 14 pharmacotherapeutic groups, 11 ATX groups, and 21 producer countries. In the US pharmaceutical market, nasal sprays are represented by 12 ATC groups, among which the largest group is R01A Decongestants. There are 4 directions for development of nasal sprays for the domestic pharmaceutical industry: 1) development of sprays, which are presented in the US pharmaceutical market; 2) development of sprays, which are absent in domestic and foreign pharmaceutical markets; 3) development of sprays, which are represented by other dosage forms; 4) development of pharmaceutical production sprays..

Keywords: nasal sprays, pharmaceutical market, assortment, development prospects.

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

1 – Ural State Medical University, Ministry of Healthcare, 3, Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: 79630315545@yandex.ru
Тел.: 8 (343) 214 85 23

ВВЕДЕНИЕ

Интраназальный путь введения является привлекательным для широкого спектра лекарственных препаратов и показаний [1]. Обусловлено это тем, что данный путь введения обеспечивает необходимое местное, а в некоторых случаях системное фармакотерапевтическое действие. Местное действие при интраназальном введении обеспечивают деконгестанты, антигистаминные препараты и глюкокортикоиды. Среди интраназальных препаратов, обладающих системным фармакотерапевтическим действием, на фармацевтическом рынке представлены кальцитонин и десмопрессин [1, 6]. Наиболее привлекательной лекарственной формой для интраназального введения лекарственных препаратов являются спреи, которые обладают большим количеством преимуществ перед другими лекарственными формами: высокой точностью дозирования, быстрым терапевтическим эффектом, меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с другими лекарственными формами [2, 3]. Для того чтобы создать новый лекарственный препарат в виде назального спрея, необходимо владеть информацией об имеющихся лекарственных препаратах, которые в настоящее время присутствуют на отечественном и зарубежном рынках. В связи с этим важным является анализ фармацевтического рынка назальных спреев.

Целью нашего исследования было проведение сравнительного анализа ассортимента отечественного и зарубежного фармацевтических рынков назальных спреев с целью поиска перспектив их дальнейшей разработки.

Задачи исследования:

1) контент-анализ ассортимента российского фармацевтического рынка назальных спреев по торговым наименованиям (ТН); международным непатентованным наименованиям (МНН); датам государственной регистрации (ДГР); странам-производителям (СП); фармакотерапевтическим группам (ФТГ) и АТХ-группам и -подгруппам;
2) контент-анализ ассортимента назальных спреев, представленных на фармацевтическом рынке США, по международным непатентованным наименованиям (МНН); торговым наименованиям (ТН); фирмам-производителям (ФП); АТХ-группам и -подгруппам;
3) сравнительный анализ номенклатуры ассортимента назальных спреев, представленных на фармацевтических рынках Российской Федерации и США;
4) поиск перспектив дальнейшей разработки назальных спреев для отечественного фармацевтического рынка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования выступали: Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации (по состоянию на 14.04.2017 г.) [4], сайт Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов Министерства здравоохранения и социальных служб США (Food and Drug Administration, FDA, USFDA) (по состоянию на 25.06.2017 г.) [5].

Исследование фармацевтического рынка назальных спреев Российской Федерации проводилось с использованием метода контент-анализа по торговым наименованиям; международным непатентованным наименованиям; датам государственной регистрации; странам-производителям; фармакотерапевтическим группам и АТХ-группам и -подгруппам. Удельный вес в % по каждому признаку определялся в зависимости от количества торговых наименований лекарственных средств, зарегистрированных в Российской Федерации.

Изучение фармацевтического рынка назальных спреев США проводилось по международным непатентованным наименованиям (МНН); торговым наименованиям (ТН); фирмам-производителям (ФП); АТХ-группам и -подгруппам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Контент-анализ номенклатуры ассортимента фармацевтического рынка назальных спреев Российской Федерации показал, что ассортимент лекарственных препаратов представлен 122 торговыми наименованиями, 30 МНН, 21 страной-производителем, 14 фармакотерапевтическими группами. Наибольший удельный вес (в зависимости от количества торговых наименований) по МНН занимают ксилометазолин (в т.ч. в комбинации с др.) (30%) и оксиметазолин (11%) (рисунок 1а), среди фармакотерапевтических групп наиболее представлены группы «Противоконгестивные средства» (53%), «Глюкокортикостероиды для местного применения» (14%), «Носа заболеваний средства лечения» (9%) (рисунок 1б). Лидерами среди стран-производителей являются Россия (28%), Германия (17%) и Италия (8%) (рисунок 1в).

Анализ ассортимента назальных спреев по признаку «дата государственной регистрации» показал, что назальные спреи появились на отечественном фармацевтическом рынке в 2004 г., за период с 2004 по 2017 гг. было зарегистрировано 122 ТН ЛП, среди которых наибольшее количество ТН ЛП было зарегистрировано в 2009 г. (21%), 2010 г. (17%), 2008 г. (18%) (рисунок 1г).

Было установлено, что назальные спреи представлены 11 АТХ-группами.

Группа «R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения» включает в себя 6 подгрупп: «*R01AA Симпатомиметики*» [ксилометазолин (ксилометазолина гидрохлорид) (R01AA07), нафазолин (нафазолина нитрат) (R01AA08), оксиметазолин (оксиметазолина гидрохлорид) (R01AA05), трамазолин (трамазолина гидрохлорида моногидрат) (R01AA09), фенилэфрин (фенилэфрина гидрохлорид) (R01AA04)]; «*R01AB Симпатомиметики в комбинации с другими препаратами (исключая кортикостероиды)*» [ксилометазолин (ксилометазолина гидрохлорид) + декспантенол (R01AB06), ипратропия бромид + ксилометазолин (R01AB06), ацетилцистеин+туаминогептан (R01AB08), диметинден + фенилэфрин (R01AB01)]; «*R01AC Противоаллергические препараты (исключая кортикостероиды)*» [азеластин (R01AC03), левокабастин (R01AC02), кромоглициевая кислота (R01AC01)]; «*R01AD Кортикостероиды*» [беклометазон (беклометазона дипропионат) (R01AD01), будесонид (R01AD05), мометазон (мометазона фуроата моногидрат) (R01AD09), флутиказон (флутиказона пропионат) (R01AD08), флутиказона фуроат (R01AD08), дексаметазон (дексаметазона натрия метасульфобензоат) (в комбинации с др.: неомицин + полимиксин В + фенилэфрин) (R01AD53)]; «*R01AX Прочие* препараты для местного применения при заболеваниях носа» [фрамицетин (фрамицетина сульфат) (R01AX08), морская вода (R01AX10), натрия хлорид (R01AX10)]; комбинированные лекарственные препараты, содержащие в своем составе противоаллергическое лекарственное средство и кортикостероид, представлены подгруппой «*R01AC* Противоаллергические препараты + *R01AD* Кортикостероиды» [азеластин (R01AC03) + мометазон (R01AD09) (R01A)].

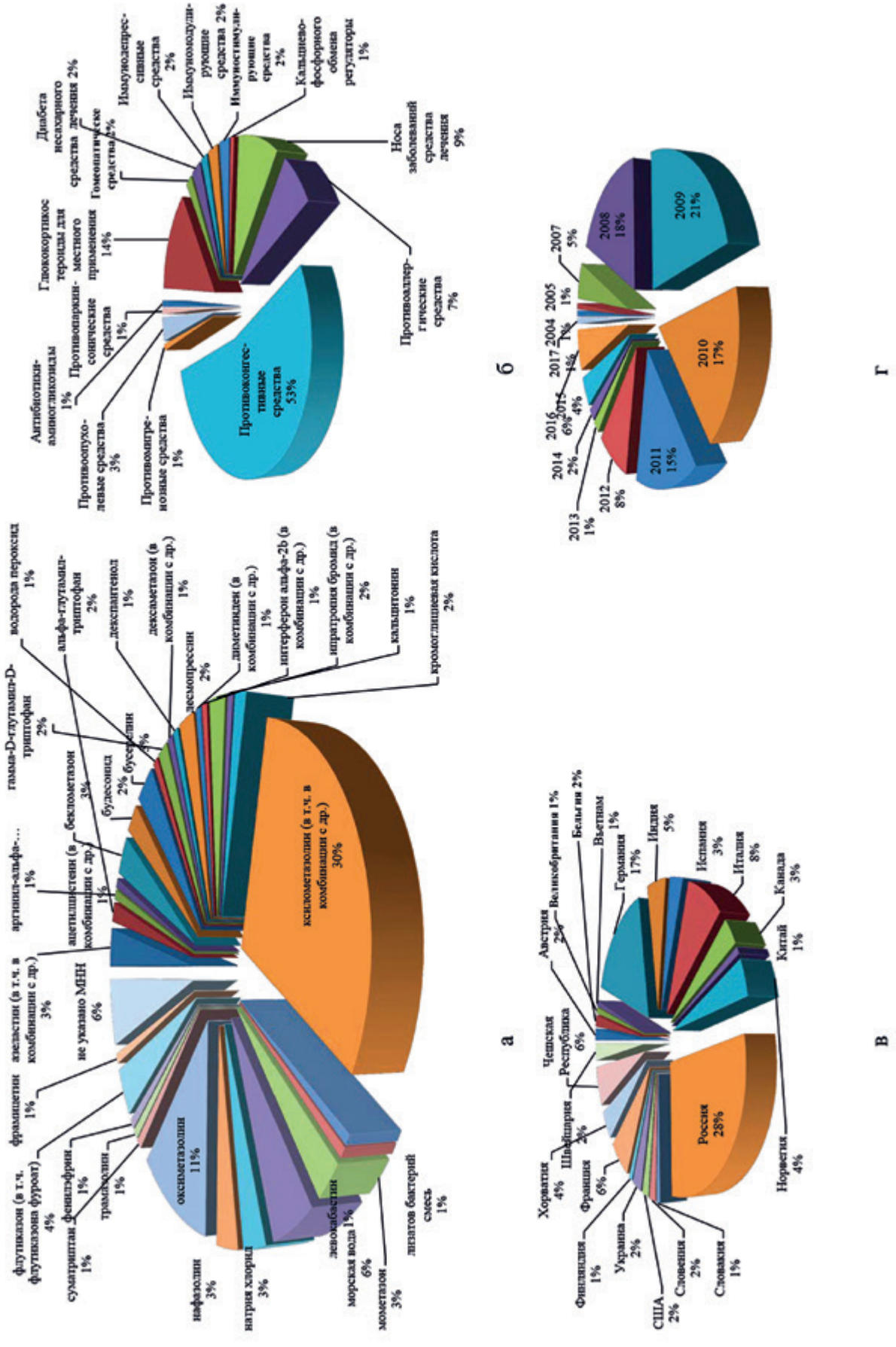


Рисунок 1. Удельный вес зарегистрированных назальных спреев по МНН (а), фармакотерапевтическим группам (б), странам-производителям (в) и датам государственной регистрации (г) (в % от всего количества торговых наименований назальных спреев)

Группа «R07A Другие препараты для лечения заболеваний органов дыхания» представлена подгруппой «*R07AX Прочие препараты для лечения заболеваний органов дыхания*» [лизатов бактерий смесь (R07AX)].

Группа «L03A Иммуностимуляторы» включает в себя 2 подгруппы: «*L03AB Интерфероны*» [интерферон альфа-2b + таурин (L03AB05)] и «*L03AX Прочие иммуностимуляторы*» [альфа-глутамил-триптофан (тимоген натрия) (L03AX), аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (L03AX)].

Группа «L04A Иммунодепрессанты» представлена подгруппой «*L04AA Селективные иммунодепрессанты*» [гамма-D-глутамил-D-триптофан (L04AA)].

Группа «H01B Гормоны задней доли гипофиза» представлена подгруппой «*H01BA Вазопрессин и его аналоги*» [десмопрессин (десмопрессина ацетата гидрат) (H01BA02)].

Группа «H05B Антипаратиреоидные гормоны» представлена подгруппой «*H05BA Препараты кальцитонина*» [кальцитонин (H05BA01)].

Группа «D03A Препараты, способствующие нормальному рубцеванию» представлена подгруппой «*D03AX Прочие препараты, способствующие нормальному рубцеванию*» [декспантенол (D03AX03)].

Группа «N02C Противомигренозные препараты» представлена подгруппой «*N02CC Селективные агонисты 5HT$_1$-рецепторов*» [суматриптан (N02CC01)].

Группа «L02A Гормоны и их производные» представлена подгруппой «*L02AE Аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона*» [бусерелин (L02AE01)].

Группа «Антипаркинсонические препараты» представлена МНН водорода пероксид под торговым наименованием «Паркон».

Группа «Гомеопатические средства» представлена торговыми наименованиями «Афлубин-Назе», «Эуфорбиум композитум», «Назентропфен С», «Люффель».

Ассортимент назальных спреев, представленный на фармацевтическом рынке Российской Федерации, приведен в таблице 1.

С целью поиска перспектив дальнейшей разработки назальных спреев для отечественной фармацевтической отрасли был проведен анализ номенклатуры ассортимента назальных спреев, представленных на фармацевтическом рынке США (таблица 2).

Было установлено, что ассортимент назальных спреев фармацевтического рынка США представлен 12 АТХ-группами: «R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения», «R03B Другие препараты для ингаляционного применения для лечения бронхиальной астмы», «N02A Опиоиды», «H05B Антипаратиреоидные гормоны», «H01B Гормоны задней доли гипофиза», «H01C Гормоны гипоталамуса», «N02C Противомигренозные препараты», «N01A Препараты для общей анестезии», «N07B Препараты, применяемые при психологической или физиологической зависимости от различных веществ», «A06A Слабительные препараты», «M01A Нестероидные противовоспалительные препараты», «B03B Витамин B$_{12}$ и фолиевая кислота».

Группа «R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения» включает 4 подгруппы: «*R01AA Симпатомиметики*» [oxymetazoline hydrochloride (R01AA05); tetracaine hydrochloride под торговым наименованием «Kovanaze», содержащий в своем составе противоконгестивное лекарственное средство (альфа-адреномиметик) и местный анестетик], «*R01AC* Противоаллергические препараты (исключая кортикостероиды)» [azelastine hydrochloride (R01AC03), cromolynsodium (R01AC01), olopatadine hydrochloride (R01AC08)], «*R01AD Кортикостероиды*» [beclomethasone dipropionate (monohydrate) (R01AD01), budesonide (R01AD05), ciclesonide (R01AD13), fluticasone propionate (R01AD08), fluticasone furoate (R01AD12), flunisolide (R01AD04), mometasone furoate (R01AD09)], комбинированные препараты, содержащие в своем составе противоаллергическое лекарственное средство и кортикостероид, представленные подгруппой «*R01AC Противоаллергические препараты + R01AD Кортикостероиды*» [azelastine hydrochloride (R01AC03); fluticasone propionate (R01AD08)].

Группа «R03B Другие препараты для ингаляционного применения для лечения бронхиальной астмы» включает 2 подгруппы: «*R03BA Глюкокортикоиды*» [triamcinolone acetonide (R03BA06)], «*R03BB Холиноблокаторы*» [ipratropium bromide (R03BB01)].

Группа «N02A Опиоиды» представлена подгруппой «*N02AF Производные морфина*» [butorphanol tartrate (N02AF01)].

Группа «H05B Антипаратиреоидные гормоны» представлена подгруппой «*H05BA Препараты кальцитонина*» [calcitonin salmon (в т.ч. recombinant) (H05BA01)].

Группа «H01B Гормоны задней доли гипофиза» представлена подгруппой «*H01BA Вазопрессин и его аналоги*» [desmopressin acetate (H01BA02)].

Группа «H01C Гормоны гипоталамуса» представлена подгруппой «*H01CA Гонадотропин-рилизинг-гормоны*» [nafarelin acetate (H01CA02)].

Группа «N02C Противомигренозные препараты» включает 2 подгруппы: «*N02CA* Алкалоиды спорыньи» [dihydroergotamine mesylate (N02CA01)] и «*N02CC Селективные агонисты 5HT$_1$-рецепторов*» [sumatriptan (N02CC01), zolmitriptan (N02CC03)].

Группа «N01A Препараты для общей анестезии» представлена подгруппой «*N01AH Опиоидные анальгетики*» [fentanyl citrate (N01AH01)].

Таблица 1.

Ассортимент назальных спреев, представленный на фармацевтическом рынке Российской Федерации

№ п/п	АТХ-группа	АТХ-подгруппа	МНН / Код АТХ	Торговые наименования
1	R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения	R01AX Прочие препараты для местного применения при заболеваниях носа	фрамицетин (фрамицетина сульфат) (R01AX08)	Изофра
			морская вода (R01AX10)	Аква Марис® Стронг, «Флуимарин», «Алергол морская вода» («Доктор Тайсс»), «Ринотайсс Морская вода», «Мореназал», «Аква Марис», «Физиомер», «Аква Марис Плюс»
			натрия хлорид (R01AX10)	«Аква-риносоль», «Ризосин», «АкваМастер», «Назол Аква», «Салин»
		R01AD Кортикостероиды	беклометазон (беклометазона дипропионат) (R01AD01)	Аллергорус®, «Беклометазон», «Риноклинил», «Беклометазон Орион Фарма», «Насобек»
			будесонид (R01AD05)	Будостер®, «Будерин», Тафен® назаль
			мометазон (мометазона фуроата моногидрат) (R01AD09)	«Дезринит», Нозефрин®, «Момат рино», «Назонекс»
			флутиказон (флутиказона пропионат) (R01AD08)	«Синофлурин», «Флутиказон», «Назарел», «Фликсоназе»
			флутиказона фуроат (R01AD08)	«Авамис»
			дексаметазон (дексаметазона натрия метасульфобензоат) (в комбинации с др.: неомицин + полимиксин В + фенилэфрин) (R01AD53)	«Полидекса» с фенилэфрином
		R01AA Симпатомиметики	ксилометазолин (ксилометазолина гидрохлорид) (R01AA07)	Ринорус®, «Ксилометазолин», Ксилен®, «Эвказолин Аква», Риномарис®, Риностоп®, Эспазолин®, «Ксилометазолин-СОЛОфарм», «Ксилен актив», «Инфлюрин», «Суприма-НОЗ», «Ксимелин Эко» с ментолом», «Ксимелин Эко», «Снуп», «Звездочка нос», Тизин® Эксперт, Тизин® Ксило БИО, Отривин®, «Гриппостад Рино», ДЛЯНО®С, Тизин® Классик, Тизин® Ксило, «Ринонорм», «Ринотайсс», «Ксимелин» («Доктор Тайсс»)
			нафазолин (нафазолина нитрат) (R01AA08)	«Нафтизин», «Санорин»
			оксиметазолин (оксиметазолина гидрохлорид) (R01AA05)	«Викс Актив Синекс», Називин® Сенситив, «Назоспрей», Африн® экстро, Африн®, «Африн увлажняющий», «Оксифрин», «Оксиметазолин», «Нокспрей», «Несопин», «Назол», Називин®, «Назол Адванс», «Саноринчик»
			трамазолин (трамазолина гидрохлорида моногидрат) (R01AA09)	«Лазолван Рино»
			фенилэфрин (фенилэфрина гидрохлорид) (R01AA04)	«Назол Кидс»
		R01AB Симпатомиметики в комбинации с другими препаратами (исключая кортикостероиды)	ксилометазолин (ксилометазолина гидрохлорид) + декспантенол (R01AB06)	Назик®, Назик® для детей, СептаНазал®
			ипратропия бромид + ксилометазолин (R01AB06)	«Отривин Комплекс», «Ксимелин Экстра»,
			ацетилцистеин + туаминогептан (R01AB08)	«Ринофлуимуцил»
			диметинден + фенилэфрин (R01AB01)	Виброцил®
		R01AC Противоаллергические препараты (исключая кортикостероиды)	азеластин (R01AC03)	Аллергодил® С, Аллергодил®
			левокабастин (R01AC02)	Тизин® Алерджи, «Реактин»
			кромоглициевая кислота (R01AC01)	«КромоГексал», «Кромоглин»
		R01AC Противоаллергические препараты (исключая кортикостероиды) + R01AD Кортикостероиды	азеластин (R01AC03) + мометазон (R01AD09) (R01A)	«Момат рино Адванс»

Окончание табл. 1

№ п/п	АТХ-группа	АТХ-подгруппа	МНН / Код АТХ	Торговые наименования
2	R07A Другие препараты для лечения заболеваний органов дыхания	R07AX Прочие препараты для лечения заболеваний органов дыхания	лизатов бактерий смесь (R07AX)	ИРС® 19
3	L03A Иммуностимуляторы	L03AB Интерфероны	интерферон альфа-2b + таурин (L03AB05)	«Генферон Лайт»
		L03AX Прочие иммуностимуляторы	альфа-глутамил-триптофан (тимоген натрия) (L03AX)	Тимоген®, «Тимоген»
			аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (L03AX)	«Имунофан»
4	L04A Иммунодепрессанты	L04AA Селективные иммунодепрессанты	гамма-D-глутамил-D-триптофан (L04AA)	«Тимодепрессин», Тимодепрессин®
5	H01B Гормоны задней доли гипофиза	H01BA Вазопрессин и его аналоги	десмопрессин (десмопрессина ацетата гидрат) (H01BA02)	«Пресайнекс», «Десмопрессин», «Вазомирин»
6	H05B Антипаратиреоидные гормоны	H05BA Препараты кальцитонина	кальцитонин (H05BA01)	«Миакальцик»
7	D03A Препараты, способствующие нормальному рубцеванию	D03AX Прочие препараты, способствующие нормальному рубцеванию	декспантенол (D03AX03)	«Мореаль плюс»
8	N02C Противомигренозные препараты	N02CC Селективные агонисты $5HT_1$-рецепторов	суматриптан (N02CC01)	«Имигран»
9	L02A Гормоны и их производные	L02AE Аналоги гонадотропин-рилизинг гормона	бусерелин (L02AE01)	«Бусерелин ФСинтез», «Бусерелин»
10	N04 Антипаркинсонические препараты	–	водорода пероксид (N04)	«Паркон»
11	Гомеопатические средства	–	–	«Афлубин-Назе», «Эуфорбиум композитум», «Назентропфен С», «Люффель»

Группа «N07B Препараты, применяемые при психологической или физиологической зависимости от различных веществ» представлена подгруппой «*N07BA* Препараты, применяемые при никотиновой зависимости» [nicotine (N07BA01)].

Группа «A06A Слабительные препараты» представлена подгруппой «*A06AH* Антагонисты периферических опиоидных рецепторов» [naloxone hydrochloride (A06AH04)].

Группа «M01A Нестероидные противовоспалительные препараты» представлена подгруппой «*M01AB* Производные уксусной кислоты» [ketorolactromethamine (M01AB15)].

Группа «B03B Витамин B12 и фолиевая кислота» представлена подгруппой «*B03BA* Цианокобаламин и его производные» [cyanocobalamin (B03BA01)].

Проведенные исследования позволили выделить четыре направления дальнейшей разработки назальных спреев. Выбор первого направления обусловлен необходимостью разработки отечественных препаратов в виде назального спрея, которые в настоящее время представлены только на фармацевтическом рынке США, поскольку в нашей стране имеется терапевтическая необходимость в этих препаратах для лечения конкретных заболеваний. Второе направление разработки назальных спреев позволит расширить номенклатуру ассортимента лекарственных препаратов на фармацевтическом рынке Российской Федерации с целью комплексного лечения и профилактики заболеваний. Выбор третьего направления обусловлен необходимостью обеспечения удобства при приеме препарата, а в некоторых случаях повышения его биодоступностей. Четвертое направление позволит реализовать задачу лечения конкретного пациента и учесть его патофизиологические и возрастные особенности.

Направления дальнейшей разработки назальных спреев для отечественного фармацевтического рынка представлены ниже.

1. Разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время представлены на фармацевтическом рынке США:

- комбинация противоконгестивного лекарственного средства (альфа-адреномиметик) и местного анестетика;
- нестероидное противовоспалительное средство;
- цианокобаламин и др.

Таблица 2.

Ассортимент назальных спреев, представленный на фармацевтическом рынке США

№ п/п	АТХ-группа	АТХ-подгруппа	МНН / Код АТХ	Торговые наименования	Фирма производитель
1	R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения	R01AC Противоаллергические препараты (исключая кортикостероиды)	azelastine hydrochloride (R01AC03)	Astelin	Mylan Speciality LP
				Astepro	Mylan Speciality LP
				Azelastine	West-Ward Pharms Int
				Azelastine hydrochloride	Amneal Hharms, Apotex Inc., Upsher-Smith Labs, Perrigo Israel, West-Ward Pharms Int, Breckenridge Pharm, Sun Pharma Global, Apotex Inc.
			cromolyn sodium(R01AC01)	Nasalcrom	Blacksmith Brands
			olopatadine hydrochloride (R01AC08)	Patanase	Novartis Pharms Corp
				Olopatadine hydrochloride	Apotex Inc., Perrigo Israel
		R01AD Кортикостероиды	beclomethasone dipropionate (monohydrate) (R01AD01)	Beconase	GlaxoSmithKline
				Beconase aq	GlaxoSmithKline
				Vancenase aq	Schering
				Qnasl	Teva Branded Pharm
			budesonide (R01AD05)	Budesonide	Apotex Inc.
				Rhinocort	Astrazeneca Pharms
				Rhinocort allergy	Astrazeneca Pharms
			ciclesonide (R01AD13)	Zetonna	Takeda Gmbh
				Omnaris	Nycomed US Inc., Takeda Gmbh
			fluticasone propionate (R01AD08)	Flonase	GlaxoSmithKline
				Flonase allergy relief	GlaxoSmithKline Cons
				Fluticasone propionate	Wockhardt, West-Ward Pharms Int, West-Ward Pharms Int, Apotex Inc., Hi Tech Pharma
			fluticasone furoate (R01AD12)	Flonase sensimist allergy relief	GlaxoSmithKline
			flunisolide (R01AD04)	Flunisolide	Hi Tech Pharma Co, Apotex Inc., Bausch and Lomb
				Nasalide	Ivax Res
				Nasarel	Teva Branded Pharm
			mometasone furoate (R01AD09)	Mometasone furoate	Apotex Inc., Amneal Pharms
				Nasonex	Merck Sharp Dohme
		R01AC Противоаллергические препараты + R01AD Кортикостероиды	azelastine hydrochloride (R01AC03); fluticasone propionate (R01AD08)	Azelastine hydrochloride and fluticasone propionate	Apotex Inc.
				Dymista	Mylan Speciality LP
		R01AA Симпатомиметики	oxymetazoline hydrochloride (R01AA05); tetracaine hydrochloride	Kovanaze	St. Renatus

Окончание табл. 2

№ п/п	АТХ-группа	АТХ-подгруппа	МНН / Код АТХ	Торговые наименования	Фирма производитель
2	R03B Другие препараты для ингаляционного применения для лечения бронхиальной астмы	R03BA Глюкокортикоиды	triamcinolone acetonide (R03BA06)	Allernaze	Lupin Atlantis
				Nasacort	Sanofi Aventis Us
				Nasacort allergy 24 hour	Sanofi Aventis Us
				Nasacort hfa	Aventis Us
		R03BB Холиноблокаторы	ipratropium bromide (R03BB01)	Atrovent	Boehringer Ingelheim
				Ipratropium bromide	Bausch and Lomb, West-Ward Pharms Int, Apotex Inc., Mylan Speciality LP
3	N02A Опиоиды	N02AF Производные морфина	butorphanol tartrate(N02AF01)	Butorphanol tartrate	Apotex Inc., West-Ward Pharms Int, Mylan
				Stadol	Bristol Myers Squibb
4	H05B Антипаратиреоидные гормоны	H05BA Препараты кальцитонина	calcitonin salmon (в т.ч. recombinant*) (H05BA01)	Calcitonin-salmon	Par Pharm, Apotex Inc.
				Miacalcin	Mylan Ireland Ltd.
				Fortical*	Upsher Smith
5	H01B Гормоны задней доли гипофиза	H01BA Вазопрессин и его аналоги	desmopressin acetate (H01BA02)	Ddavp (needs no refrigeration)	Ferring Pharms Inc.
				Desmopressin acetate	Bausch and Lomb
				Desmopressin acetate (needs no refrigeration)	Apotex Inc., Sun Pharma Global
				Minirin	Ferring
				Noctiva	Serenity Pharms LLC
				Stimate	CSL Behring
				Stimate (needs no refrigeration)	CSL Behring
6	H01C Гормоны гипоталамуса	H01CA Гонадотропин-рилизинг-гормоны	nafarelin acetate (H01CA02)	Synarel	GD Searle LLC
7	N02C Противомигренозные препараты	N02CA Алкалоиды спорыньи	dihydroergotamine mesylate (N02CA01)	Migranal	Valeant
		N02CC Селективные агонисты $5HT_1$-рецепторов	sumatriptan (N02CC01)	Sumatriptan	Lannett
			zolmitriptan (N02CC03)	Zomig	Astrazeneca
8	N01A Препараты для общей анестезии	N01AH Опиоидные анальгетики	fentanyl citrate (N01AH01)	Lazanda	Depomed Inc.
9	N07B Препараты, применяемые при психологической или физиологической зависимости от различных веществ	N07BA Препараты, применяемые при никотиновой зависимости	nicotine (N07BA01)	Nicotrol	Pfizer Inc.
10	A06A Слабительные препараты	A06AH Антагонисты периферических опиоидных рецепторов	naloxone hydrochloride (A06AH04)	Narcan	Adapt
11	M01A Нестероидные противовоспалительные препараты	M01AB Производные уксусной кислоты	ketorolac tromethamine (M01AB15)	Sprix	Egalet Us Inc.
12	B03B Витамин B12 и фолиевая кислота	B03BA Цианокобаламин и его производные	cyanocobalamin (B03BA01)	Calomist	Par Pharm
				Nascobal	Endo Pharms Inc.

2. Разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время отсутствуют на отечественном и зарубежном фармацевтических рынках:

- противомикробное средство;
- противовирусное средство;
- противогрибковое (противомикотическое) средство;
- комбинация противомикробного и противовирусного средств;
- комбинация противомикробного, противовирусного и противогрибкового (противомикотического) средств;
- комбинация противомикробного средства и местного анестетика;
- комбинация противомикробного и противоконгестивного средств;
- комбинация противомикробного и противоаллергического средств;
- комбинация противовирусного и противоаллергического средств;
- комбинация противовирусного и противоконгестивного средств;
- комбинация противовирусного средства и местного анестетика и другие комбинации.

3. Разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время представлены на отечественном и зарубежном фармацевтических рынках другими лекарственными формами (назальные капли, аэрозоли и другие).

4. Разработка составов и технологии изготовления назальных спреев аптечного изготовления с учетом индивидуальных особенностей пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что ассортимент отечественного фармацевтического рынка назальных спреев представлен 122 торговыми наименованиями, 30 МНН, 21 страной-производителем, 14 фармакотерапевтическими группами. Наибольший удельный вес (в зависимости от количества торговых наименований) по МНН занимают ксилометазолин (в т.ч. в комбинации с др.) (30%) и оксиметазолин (11%), среди фармакотерапевтических групп наиболее представлены группы: «Противоконгестивные средства» (53%), «Глюкокортикостероиды для местного применения» (14%), «Носа заболеваний средства лечения» (9%). Лидерами среди стран-производителей являются Россия (28%), Германия (17%) и Италия (8%). Анализ рынка показал, что назальные спреи появились на отечественном фармацевтическом рынке в 2004 г., за период с 2004 по 2017 гг. было зарегистрировано 122 ТН ЛП, среди которых наибольшее количество ТН ЛП было зарегистрировано в 2009 г. (21%), 2010 г. (17%), 2008 г. (18%). Ассортимент назальных спреев фармацевтического рынка США представлен 12 АТХ-группами: «R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения», «R03B Другие препараты для ингаляционного применения для лечения бронхиальной астмы», «N02A Опиоиды», «H05B Антипаратиреоидные гормоны», «H01B Гормоны задней доли гипофиза», «H01C Гормоны гипоталамуса», «N02C Противомигренозные препараты», «N01A Препараты для общей анестезии», «N07B Препараты, применяемые при психологической или физиологической зависимости от различных веществ», «A06A Слабительные препараты», «M01A Нестероидные противовоспалительные препараты», «B03B Витамин B_{12} и фолиевая кислота». Проведенные исследования позволили выделить четыре направления разработки назальных спреев для отечественного фармацевтического рынка: разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время представлены на фармацевтическом рынке США; разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время отсутствуют на отечественном и зарубежном фармацевтических рынках; разработка составов и технологии получения назальных спреев для фармацевтического рынка Российской Федерации, которые в настоящее время представлены на отечественном и зарубежном фармацевтических рынках другими лекарственными формами; разработка составов и технологии изготовления назальных спреев аптечного изготовления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Маркс, М. Биркхофф, Г. Вилльямс. Интраназальное введение лекарств – интересное прошлое и замечательное будущее. Фармацевтические технологии и упаковка. 2015. URL: http://www.medbusiness.ru/Images/FTU-5_2015_70-77.pdf (дата обращения: 06.06.2017 г.)
2. М.М. Губин. Новая лекарственная форма – спрей. Отличия от аэрозолей, особенности технологии производства // Медицинский бизнес. Фармацевтические технологии и упаковка. 2008. №11. С. 76–78.
3. М.М. Губин, Г.В. Азметова. Сравнительный анализ лекарственных форм: спрей и аэрозоль // Фармация. 2008. № 7. С. 40-48.
4. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации // Росминздрав. [2015]. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx (дата обращения 14.04.2017).
5. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. 2010. Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. URL: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm (дата обращения: 25.06.2017).
6. A.C. Leary, M. Dowling, K. Cussen, J. O'Brien, R.M. Stote. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal insulin spray (Nasulin) administered to healthy male volunteers: infuence of the nasal cycle // J Diabetes Sci Technol. 2008. № 2(6). P. 1054–1060.

АНАЛИТИКА
ЭКСПО

16-я международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

24-26 апреля 2018 года
Москва, КВЦ «Сокольники»



Получите билет на analitikaexpo.com

Организатор

ITE
+7 (499) 750-08-28
analitikaexpo@ite-expo.ru

Генеральный спонсор

Фармконтракт
группа компаний

Соорганизаторы

РОС ХИМ РЕАКТИВ

Ассоциация Аналитических Центров

НАУЧНЫЙ СОВЕТ РАН
по аналитической химии

УДК 005.6

СЕРТИФИКАЦИЯ НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ ИСО 9001 КАК ПЕРВЫЙ ЭТАП ВНЕДРЕНИЯ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ В ЦЕНТРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

И.А. Наркевич[1], Е.В. Флисюк[1], А.В. Москвин[1], Л.В. Шигарова[1]*, Д.Ю. Ивкин[1], А.С. Ивкина[1]

Резюме. В Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии область сертификации системы менеджмента качества распространена на научно исследовательскую деятельность, что позволило при интеграции с существовавшей в академии процессной модели создать более универсальную и эффективную систему организации образовательной и научно-исследовательской деятельности. На основе этого опыта руководством планируется подтверждение соответствия деятельности одной из структурных единиц академии требованиям GLP. На основе практического опыта авторами продемонстрирована целесообразность внедрения системы менеджмента качества в соответствии со стандартами ИСО серии 9000 как стратегической платформы для подготовки к сертификации доклинических исследований на соответствие требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP).

Ключевые слова: система менеджмента качества, процессная модель, надлежащая лабораторная практика, внутренний аудит.

CERTIFICATION FOR THE CONFORMITY OF ISO 9001 EQUIREMENTS AS A FIRST PHASE OF IMPLEMENTATION OF GOOD LABORATORY PRACTICE IN THE CENTER OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY

I.A. Narkevich[1], E.V. Flisyuk[1], A.V. Moskvin[1], L.V. Shigarova[1]*, D.Y. Ivkin[1], A.S. Ivkina[1]

Abstract. The scope of certification of the quality management system is extended to research activities at the St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical Academy. This allowed to to create more universal and effective system of organizing educational and research activities at the Academy when the integration of the process model mentioned and existing in the academy occurred. Based on this experience, management plans to confirm the compliance of activities of one of the structural units with GLP requirements. The authors demonstrated the feasibility of implementing a quality management system in accordance with the ISO 9001 standards as a strategic platform for preparing for the certification of preclinical research for compliance with the requirements of good laboratory practice (GLP).

Keywords: quality management system, process model, good laboratory practice, audit.

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

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

*** адресат для переписки:**
E-mail: larisa.shigarova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

В Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (СПХФА) разработана, внедрена и поддерживается в актуальном состоянии система менеджмента качества (СМК) в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ ISO 9001-2011 «Межгосударственный стандарт. Система менеджмента качества. Требования» на образовательную деятельность с 2011 г.

В 2016 г. руководством СПХФА было принято стратегическое решение о расширении области сертификации системы менеджмента качества на научную деятельность с целью улучшения результативности и обеспечения прочной основы для инициатив, ориентированных на устойчивое развитие [1].

Научная деятельность СПХФА распространяется на все этапы жизненного цикла лекарственных средств. Главным образом научный потенциал реализуется на этапе фармацевтической разработки, а именно: в поиске новых фармакологически активных веществ, разработке технологии новых лекарственных препаратов, доклинических исследованиях, взаимодействии с участниками международного фармацевтического сообщества.

В 2015 г. вышла новая версия стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015. При распространении СМК на научную деятельность принято решение дополнительно руководствоваться требованиями нового документа, несмотря на то, что расширение области сертификации проводилось по требованиям ГОСТ ISO 9001-2011.

На ближайшую перспективу запланирована сертификация центра экспериментальной фармакологии СПХФА на соответствие требованиям надлежащей лабораторной

практики (GLP). Как показывает опыт надлежащих практик, целесообразно при построении систем, обеспечивающих качество выполняемой деятельности, обращаться за методологической поддержкой к стандартам ИСО серии 9000. Наглядным примером может служить фармацевтическая система качества, обязательная в соответствии с российскими и международными требованиями надлежащей производственной практики (GMP) и опирающаяся на методологию ИСО 9001 [2].

Правила надлежащей лабораторной практики утверждены приказом Минздрава России от 1 апреля 2016 г. № 199н и регламентируются ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [3–6].

Ранее нами был описан опыт распространения СМК на научно-исследовательскую деятельность в соответствии с требованиями стандартов ИСО 9001 [1].

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ОБЛАСТИ СЕРТИФИКАЦИИ СМК НА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Ниже перечислены основные этапы распространения области сертификации СМК СПХФА на научно-исследовательскую деятельность:

- построение процессной модели;
- документирование административных процессов и процессов жизненного цикла;
- проведение внутреннего аудита;
- анализ эффективности и результативности СМК со стороны высшего руководства.

Возглавляет процесс научно-исследовательской деятельности СПХФА проректор по научной работе. Основными подразделениями процесса являются: отдел научно-исследовательских работ (ОНИР), патентно-лицензионный отдел (ПЛО), центр экспериментальной фармакологии (ЦЭФ), центр фармацевтической технологии (ЦФТ), испытательная лаборатория (ИЛ).

В результате анализа существующей процессной модели СПХФА и добавления в неё процесса «Научно-исследовательская деятельность» разработана процессная модель, представленная на рисунке 1.

Схема процесса «Научно-исследовательская деятельность» представлена на рисунке 2.

В рамках процесса «Научно-исследовательская деятельность» выделили следующие подпроцессы: «планирование и мониторинг научно-исследовательской деятельности»; «патентно-лицензионная деятельность»; «фармакологические исследования»; «разработка технологии лекарственных препаратов»; «контроль качества лекарственных препаратов». Для каждого подпроцесса процесса «Научно-исследовательская деятельность» были разработаны процессные схемы.

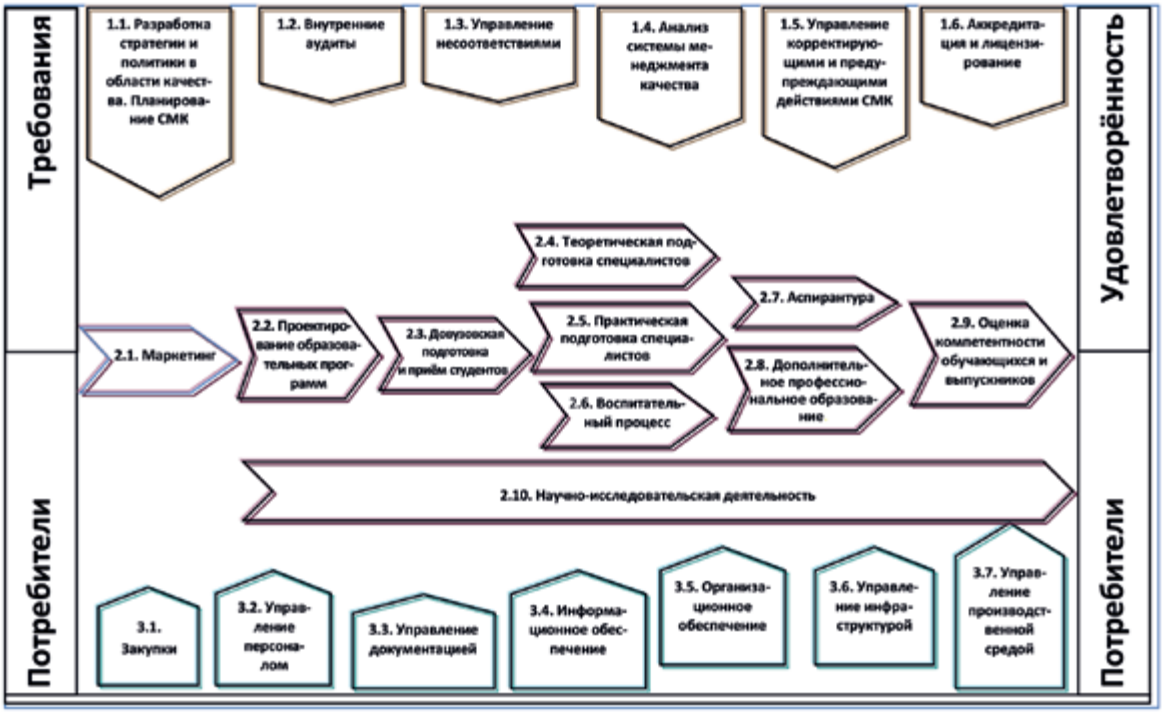


Рисунок 1. Процессная модель СМК СПХФА

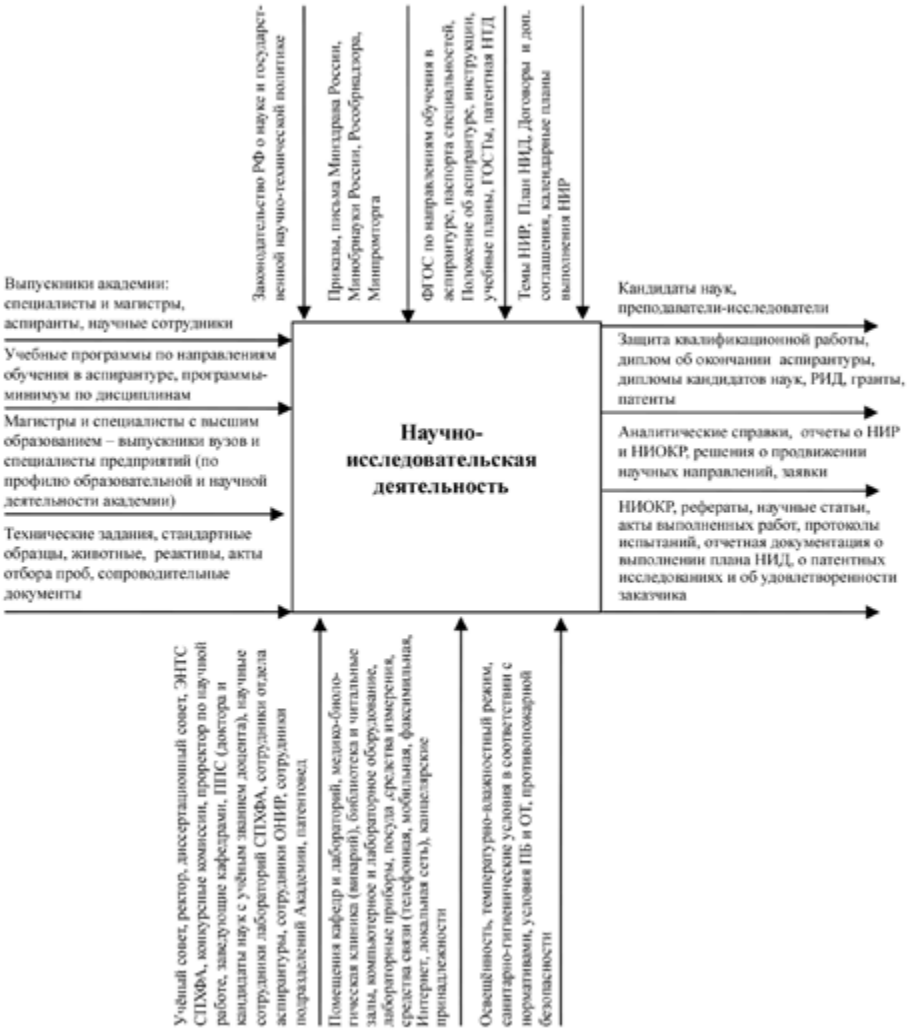


Рисунок 2. **Схема процесса нулевого уровня**

МОДЕЛЬ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЦЕНТРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

Как упоминалось выше, в ближайшей перспективе планируется подтверждение соответствия деятельности ЦЭФ требованиям надлежащей лабораторной практики. В соответствии с действующими нормативными документами нами разработана модель обеспечения качества доклинических исследований в ЦЭФ, которая гарантирует следующие.

1. Доклинические исследования лекарственных средств проводятся в соответствии с документированными методиками и процедурами с получением достоверных данных о безопасности и эффективности лекарственных средств [пп. 6–11, 24 приказа Минздрава РФ от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (далее Приказ); пп. 3.1.1.2e, 3.2, 3.7 ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (далее ГОСТ)].
2. Персонал имеет соответствующее образование, подготовку, квалификацию и опыт работы. Данные о квалификации и обучении персонала документированы (пп. 9, 24 Приказа; п. 3.1.1.2c ГОСТ).
3. Полномочия и ответственность руководящего персонала и лиц, участвующих в доклинических исследованиях, четко определены в должностных инструкциях (пп. 8, 9, 10, 24 Приказа; п. 3.1.1.2d; 3.1.4 ГОСТ).
4. Лицо, отвечающее за доклинические исследования, осуществляет и контролирует: проведение доклинического исследования в соответствии с протоколом исследования; оперативный контроль соблюдения установленных стандартных методов и процедур, сбор и документирование полученных данных; регистрацию всех отклонений от протокола исследования и установленных процедур и принятие мер по их устранению, интерпретацию и анализ получаемых данных, составление отчета об исследовании; обеспечение конфиденциальности полученных результатов (п. 10 Приказа; пп. п. 3.1.1.2a, g; 3.1.2 ГОСТ).

5. Помещения, предназначенные для проведения доклинических исследований лекарственных средств, спроектированы, расположены, подготовлены и эксплуатируются таким образом, чтобы обеспечить выполнение всех требований безопасности при проведении исследований (пп. 5, 7, 12 Приказа; п. 3.3 ГОСТ).
6. Для использования в исследовательской работе допускается измерительное и испытательное оборудование, которое прошло поверку или иной необходимый, в том числе и метрологический, контроль, установленный для данного вида оборудования, о чём имеется документальное свидетельство (пп. 7, 13, 14, 24 Приказа; пп. 3.4.1–3.4.3 ГОСТ).
7. Эксплуатация оборудования уполномоченным персоналом допускается только в соответствии с документацией на оборудование в виде инструкций, официально утверждённых в соответствии с принятым в организации порядком (п. 7 Приказа; пп. 3.4.1–3.4.3 ГОСТ).
8. Используемые при испытаниях тест-системы, реактивы и реагенты соответствуют требованиям, указанным в протоколе исследования и имеют соответствующую маркировку (п. 5, 15 Приказа; п. 3.4.3–3.4.4; 3.5; 3.6 ГОСТ).
9. Обеспечены оптимальные физические, химические и биологические параметры для содержания экспериментальных животных и проведения доклинических исследований. Процедуры документированы, контроль за их выполнением осуществляется посредством регулярных записей (пп. 16, 17 Приказа; п. 3.5.2 ГОСТ).
10. Предусмотрены меры, обеспечивающие утверждённый порядок выполнения всех лабораторных и производственных операций (пп. 18, 19 Приказа; п. 3.8 ГОСТ).
11. Обеспечены условия для сбора, обработки и хранения первичных данных доклинического исследования, все необходимые процедуры документированы (пп. 20, 21 Приказа).
12. Процесс создания отчета о результатах доклинического исследования выполняется в соответствии с требованиями и отражён в необходимой документации (пп. 22, 23 Приказа; п. 3.9 ГОСТ).
13. Обеспечены условия соблюдения конфиденциальности и хранения материалов доклинического исследования (пп. 24, 25, 26 Приказа; п. 3.10 ГОСТ).
14. Порядок проведения внутреннего аудита позволяет регулярно оценивать эффективность системы обеспечения качества (пп. 8, 10, 24 Приказа; п. 3.2.2.1с ГОСТ).

Модель обеспечения качества внедряется в ЦЭФ в соответствии с утверждённым планом-графиком.

На этапе разработки и внедрения процессной модели в рамках СМК для подпроцесса «фармакологические исследования» разработана карта процесса. При организации деятельности ЦЭФ в соответствии с картой процесс осуществляется в управляемых условиях, что позволяет систематически обеспечивать качество выполняемых научных исследований в соответствии с разработанной моделью.

На рисунке 3 представлена схема взаимодействия ЦЭФ с внешней средой.



Рисунок 3. Взаимодействие ЦЭФ с заинтересованными сторонами

На рисунке 4 показана схема первого уровня подпроцесса «фармакологические исследования» (управляет подпроцессом центр экспериментальной фармакологии).

На заключительном этапе распространения области сертификации СМК на научно-исследовательскую деятельность был проведён внутренний аудит процесса и подразделений, в него входящих. Внутренний аудит проводили в соответствии с утверждённой программой. По результатам внутренних проверок составлены отчёты и акты выявленных несоответствий. Разработаны необходимые корректирующие действия.

Высшим руководством проведён анализ эффективности и результативности СМК в области научно-исследовательской деятельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам анализа СМК в области научно-исследовательской деятельности высшим руководством СПХФА принято решение о дальнейшем планировании деятельности научных подразделений в рамках СМК с учетом проведенного анализа. В настоящее время область сертификации СПХФА включает образовательную и научно-исследовательскую деятельность.



Рисунок 4 Схема первого уровня подпроцесса «фармакологические исследования»

В результате распространения области сертификации СМК СПХФА на научно-исследовательскую деятельность создана прочная основа для дальнейшей подготовки центра экспериментальной фармакологии по организации деятельности в соответствии с требованиями правил надлежащей лабораторной практики.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.А. Наркевич, Е.В. Флисюк, Л.В. Шигарова, А.В Москвин. Распространение системы менеджмента качества на научную деятельность // Экономика качества. 2016. № 4(16).
2. ICH Q10. Pharmaceutical Quality System. June 2008. URL: htpp://www.ich.org (дата обращения 20.10.2017).
3. А.А. Крылатова, И.Е. Шохин, Е.П. Образцова, А.О. Монаенков. Опыт сертификации биоаналитической лаборатории согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 218–221.
4. М.С. Журавлева, М.В. Лебедева. Обзор основных изменений в правилах надлежащей лабораторной практики (приказ от 01 апреля 2016 г. № 199н, введенный взамен приказа Минздрава от 23 августа 2010 г. № 708н) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1(18). С. 212–215.
5. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартинформ, 2014.
6. ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Системы менеджмента качества. Требования. – М.: Стандартинформ, 2015.

Федеральная сеть сервисных центров «Фармконтракт»

В рамках клиентского сервиса Вы получаете следующий комплекс услуг по техническому обслуживанию оборудования ведущих мировых производителей:



Инсталляция, IQ/OQ/PQ квалификационные работы и калибровка оборудования в соответствии с требованиями нормативов USP, FIP и GMP



Составление досье на оборудование



Сервисное обслуживание: настройка, поверка и калибровка, валидация, аттестация и идентификация оборудования



Обучение персонала работе на новых моделях оборудования, правилам текущего ремонта и обслуживания



Разработка методик анализа и их установка на конкретную модель прибора заказчика



Метрологическое обслуживание средств измерений



Гарантийное и пост гарантийное обслуживание оборудования от сертифицированных сервисных инженеров



Валидация чистых помещений



«Фармконтракт Сервис» - авторизованный сервисный центр

büchi glas uster · SKALAR · BUCHI · SYSTAG · ESCO · METTLER TOLEDO · NATOLI · SCHMIZO · INTEGRA · GERSTEL · Agilent Technologies · CHRIST · Julabo · BINDER · Miele PROFESSIONAL · Nabertherm · CISA · INFORS HT · MERCK · IKA · sigma · sotax · pharmatron · SEJONG · sartorius · 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*

Pharmcontract group of companies — ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (499) 674-09-45 (центральный офис в Москве)

8 (800) 333-93-92 (бесплатный звонок)

wwwphct-service.ru

info@phct-service.ru

ИНФОРМАЦИЯ ОТ РЕДАКЦИИ О ПРОШЛЫХ ПУБЛИКАЦИЯХ

Настоящим сообщением уведомляем, что в журнале № 4(21) за ноябрь 2017 г. в статье *Савельева К.Р., Персанова Л.В., Шестаков В.Н., Поляков С.В.* **«Разработка методики определения характеристической вязкости инъекционного препарата на основе хондроитина сульфата натрия»** (С. 154–158) на стр. 156 в третьем пункте экспериментальной части работы указано:

«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.»

Согласно письму от авторского коллектива, поступившего в Редакцию 26 января 2018 г., пункт третий экспериментальной части следует читать так:

«Раствор натрия хлорида. 11,7 г натрия хлорида помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 950 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают.»

Разработка методики определения характеристической вязкости инъекционного препарата на основе хондроитина сульфата натрия // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. № 4 (21). С.154–158.



ФОРУМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ

ФАРМАПАК

VII Международный форум ФАРМАПАК и выставка упаковочных материалов, оборудования и технологий для фармкомпаний

ВЫСТАВКА:

Решения по маркировке лекарственных препаратов, фармацевтическая упаковка, оборудование и программное обеспечение



ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА:

- Внедрение системы маркировки лекарственных препаратов на фармацевтическом производстве
- Повышение эффективности фармпроизводств
- Мотивация и обучение фармперсонала

7 ЛЕТ
ФАРМАПАК

300
ПАРТНЁРОВ

700
ПОСЕТИТЕЛЕЙ

РЕАЛЬНЫЕ КЕЙСЫ ОТ ФАРМКОМПАНИЙ

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИННОВАЦИЯХ НА РЫНКЕ

ИНТЕРАКТИВНОЕ ОБЩЕНИЕ С ЭКПЕРТАМИ И ПАРТНЕРАМИ

СТАТЬ УЧАСТНИКОМ
ПОСЕТИТЬ ВЫСТАВКУ
www.upak-forum.ru
info@ upak-forum.ru

МОСКВА
24-25 мая 2018 года
ЦВК ЭКСПОЦЕНТР

УВЕЛИЧЕНИЕ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА В 96-ЛУНОЧНЫХ ПЛАНШЕТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ INFORS HT ORBIT MULTITRON PRO С АМПЛИТУДОЙ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ 3 ММ

АВТОРЫ

А. Кук,
А. Мерлуццо,
Cell Signaling Technology, Inc.,
01923, США, Массачусетс, Данверс





Microplate Box (INFORS HT)

АННОТАЦИЯ

Растущий спрос на рекомбинантные белки привел к необходимости разработки высокопроизводительных методов культивирования и скрининга. Клеточные линии млекопитающих наиболее предпочтительны, но их трудно адаптировать к 96-луночному культивированию из-за большой потребности в кислороде и CO_2.

Недавно компания INFORS HT выпустила шейкер-инкубатор с амплитудой перемешивания 3 мм. При скорости перемешивания 800–1000 мин$^{-1}$ удалось значительно увеличить выход рекомбинантных белков и уменьшить разброс данных по сравнению с культивированием с амплитудой перемешивания 25 мм. Данный результат можно объяснить ускорением роста и улучшенной жизнеспособностью клеток ввиду оптимальной циркуляции среды. Кроме того, было выполнено исследование различных типов уплотнений и платформ, что позволило загрузить до 40 96-луночных планшетов в один инкубатор. Таким образом, получили автоматизированную высокопроизводительную систему экспрессии белка, которая существенно сокращает время процесса.

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА И ТРАНСФЕКЦИЯ

В ходе всех экспериментов использовалась клеточная линия 293E, суспензионная адаптированная линия HEK293, приобретенная в кандском Биотехнологическом научно-исследовательском институте. Культивирование проводилось во вращающихся колбах при следующих условиях: 37 °C, 5% CO_2 и скорости перемешивания 150 мин$^{-1}$. Смесь F-17 (Life Technologies) и SFM4 Transfix (GE Healthcare Life Sciences) в соотношении 1:1 использовалась в виде посевной и рабочей среды. Трансфекция осуществлялась с помощью 25-kDa линейного PEI (Polysciences) и очищенной плазмидной ДНК (Qiagen).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

Все эксперименты проводились на 96-луночных планшетах (Greiner Bio-One Masterblock) при двух скоростях перемешивания (800 и 1000 мин$^{-1}$) и объемах наполнения (500 и 1000 мкл). Трансфекция осуществлялась при рабочем объеме 50 мл с последующим отбором аликвот в 96-луночный планшет. В определенный момент времени культуру извлекали из инкубатора и осветляли центрифугированием. Определение экспрессии белка в супернатанте проводилось с помощью ВЭЖХ.

ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК И ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Плотность жизнеспособных клеток и их жизнеспособность определялись с помощью устройства для подсчета клеток TC 20 (Bio-Rad Laboratories). Образцы клеточной культуры из 96-луночных планшетов отбирались для анализа с 0 по 7 день культивирования. Для определения концентрации белка образцы супернатанта анализировались с помощью аффинного хроматографа (Agilent Technologies).

На рисунке 3 представлены полученные данные выхода белка при использовании различных типов уплотнения, различном объеме заполнения и скорости перемешивания. В ходе эксперимента при использовании трех типов уплотнений не наблюдалось никаких существенных различий в значении выхода белка. При различных условиях культивирования концентрация белка была выше в планшетах с объемом заполнения 500 мкл по сравнению с планшетами с объемом заполнения 1000 мкл (данные не показаны). Однако, принимая во внимание различия в общем объеме жидкости при различном наполнении, значения выхода, полученные при объеме заполнения 1000 мкл, были значительно выше. При различных условиях при увеличении скорости перемешивания с 800 мин$^{-1}$ до 1000 мин$^{-1}$ увеличивались значения выхода белка.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ИСПАРЕНИЯ

Провели сравнение значений испарения при различных типах герметизации: Duetz-System (Kuehner Technology), газопроницаемом мембранном уплотнителе (Axygen Scientific) и Microplate Box (INFORS HT). Испарение определялось по показателю изменения массы каждого планшета на протяжении 5 дней и было расчитано с помощью метода линейной регрессии, далее для получения значения испарения в пересчете на одну лунку полученное значение делили на 96. Каждая лунка планшета заполнялась на 1000 мкл, перемешивание осуществлялось при 1000 мин$^{-1}$ и амплитуде 3 мм в инкубаторе с влажностью 75%.

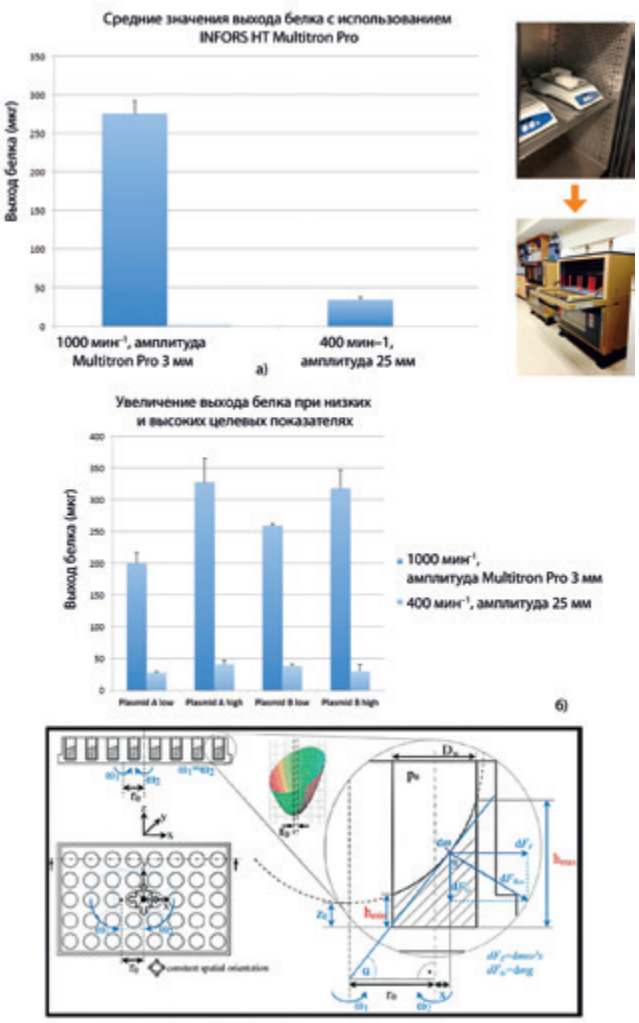


Рисунок 1. Увеличение выхода рекомбинантного белка в шейкере-инкубаторе INFORS HT Multitron Pro с амплитудой перемешивания 2 мм в сравнении с амплитудой 25 мм:

а) в экспериментах с использованием шейкера с амплитудой 25 мм, помещенного в инкубатор, среднее значение выхода рекомбинантного белка составило 33 мкг/мл. При использовании шейкера-инкубатора INFORS HT Multitron Pro среднее значение выхода составило 276 мкг/мл;

б) последующий анализ различных белков подтвердил, что данная тенденция сохраняется для всех белков вне зависимости от целевых показателей выхода

При сравнении трех коммерчески доступных типов герметизации планшетов были выявлены существенные различия в значениях остаточного объема жидкости после пяти дней культивирования с помощью INFORS HT Multitron Pro. Наименьшие потери на испарение наблюдались при использовании системы Duetz с последующем использованием Microplate Box (INFORS HT), что отражено на рисунке 4.

Использование мембранных уплотнителей привело к наивысшим потерям на испарение, которые составили примерно 30–40% в зависимости от различных форматов культивирования (рисунок 4).

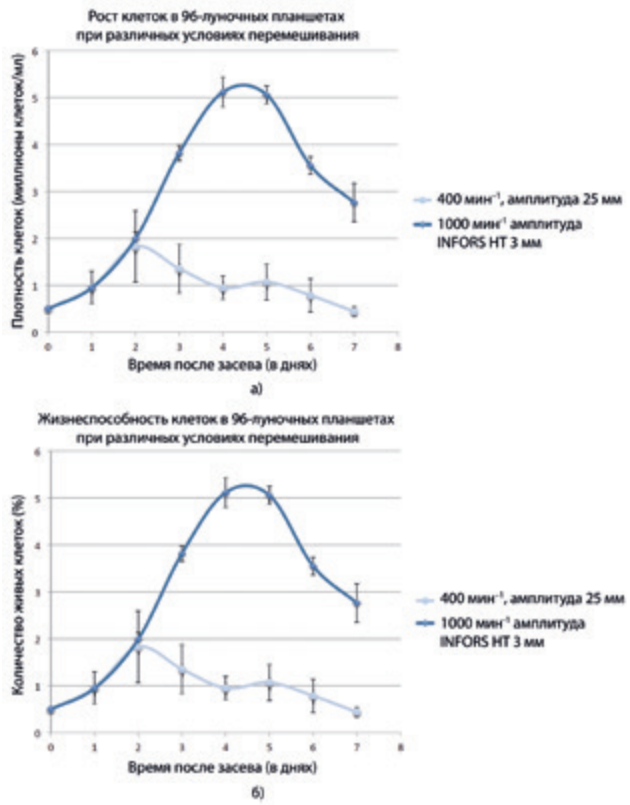


Рисунок 2. **Повышенный рост клеток вследствие улучшения переноса кислорода.**

а) При культивировании клеток в шейкере-инкубаторе INFORS HT Multitron Pro были достигнуты стандартные показатели роста в сравнении с культивированием во вращающихся колбах. Клетки, культивирование которых проводилось в орбитальном шейкере с амплитудой 25 мм при скорости вращения 400 мин$^{-1}$, не продемонстрировали заметный рост. Данный эффект можно объяснить различиями в значениях переноса кислорода.

б) Жизнеспособность клеток при использовании шейкера-инкубатора INFORS HT Multitron Pro была сравнима с жизнеспособностью клеток при культивировании во вращающихся колбах. Жизнеспособность клеток при использовании орбитального шейкера с амплитудой 25 мм при скорости вращения 400 мин$^{-1}$ заметно снизилась через день после засева и продолжила снижаться на протяжении всего эксперимента

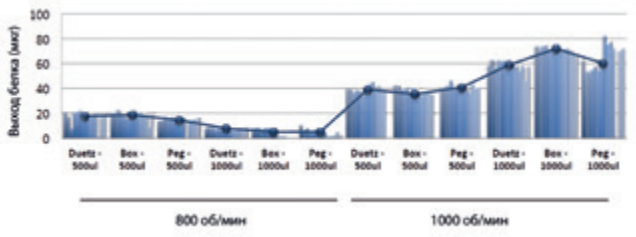


Рисунок 3. **Различия в выходе белка при использовании различных типов уплотнений, различном объеме заполнения и скорости перемешивания**

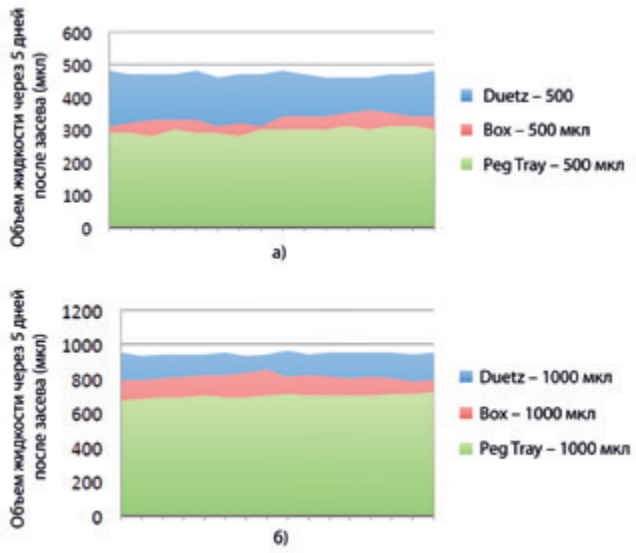


Рисунок 4. **Потери на испарение при различных типах герметизации:**

а) испарения в 96-луночных планшетах с начальным объемом 500 мкл;

б) испарения в 96-луночных планшетах с начальным объемом 1000 мкл

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование шейкера-инкубатора INFORS HT Multitron Pro при скорости перемешивания 800–1000 мин$^{-1}$ позволило существенно увеличить выход рекомбинантного белка и уменьшить разброс данных в каждой отдельно взятой лунке в сравнении с культивированием с амплитудой перемешивания 25 мм. Данный результат можно объяснить лучшим ростом и жизнеспособностью клеток вследствие оптимальной циркуляции среды. Кроме того, было выполнено сравнительное исследование культивирования при различных скоростях перемешивания, объемах заполнения планшетов и трех различных типах герметизации. Были определены следующие оптимальные параметры: объем заполнения – 1000 мкл, скорость перемешивания – 1000 мин$^{-1}$, амплитуда перемешивания – 3 мм. Использование мембранного уплотнения с Peg Tray позволило существенно увеличить выход продукта в данном эксперименте.

Полученные результаты наглядно демонстрируют высокую производительность разработанной системы для повышения экспрессии белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Optimization of mixing parameters in lab automation. URL: www.thermoshaker.com/?tag=orbital-shaker (дата обращения 15.01.2018).

2. A.B. Bos, P. Luan, J.N. Duque, D. Reilly, P.D. Harms, A.W. Wong. Optimization and Automation of an End-to-End High Throughput Microscale Transient Protein Production Process // Biotechnology and Bioengineering. 2015. V. 112. Is. 9. P. 1832–1842.

ЗНАЧИМОСТЬ ВЛАГОСОДЕРЖАНИЯ И ОБЗОР МЕТОДОВ ЕГО ИЗМЕРЕНИЯ

Материал предоставлен компанией OHAUS

ВВЕДЕНИЕ

Вода жизненно необходима. Она играет важную роль в физических и химических процессах, протекающих в нашем организме, это принципиальный компонент пищи, которую мы едим, и материалов, которые нас окружают. Во многих отраслях промышленности важное, иногда решающее значение имеет измерение влагосодержания в веществах для оценки качества, регулирования производственных процессов и обеспечения соответствия продукции нормативным требованиям. Содержание воды определяет срок годности и стабильность многих продуктов. Например, наличие воды в пищевой продукции сильно влияет на ее чувствительность к химической, ферментативной или микробной активности.

Влагосодержание также важно для производства и использования:

- косметических средств;
- фармацевтических препаратов;
- пищевых продуктов;
- средств личной гигиены;
- целлюлозно-бумажной продукции;
- химических продуктов органического синтеза.



Измерение количества воды в некоторых материалах может быть затруднительным из-за сложности молекулы воды и ее способности образовывать прочные межмолекулярные связи. В большинстве случаев измерение воды означает измерение влагосодержания, которое определяется как масса воды на единицу массы сухого материала.

Анализаторы влагосодержания серии MB компании OHAUS измеряют влажность термогравиметрически. Термогравиметрический анализ влажности основан на принципе испарения воды в процессе сушки и определяет влажность через потерю массы, наблюдаемую при нагревании образца. При этом потерю массы за счет испарения воды невозможно отличить от потери массы за счет испарения летучих компонентов

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

или разложения образца. По этой причине влагосодержание, измеренное термогравиметрическим методом, учитывает все вещества, которые испаряются при нагревании образца и вызывают потерю массы. Поэтому при анализе с помощью термогравиметрического устройства мы используем термин «содержание влаги», а не «содержание воды».

ЧТО ТАКОЕ ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛАЖНОСТИ?

Содержание влаги влияет на массу, плотность, вязкость, показатель преломления и электропроводность материала. Методы для определения содержания влаги обычно используют одно или несколько этих физических или химических свойств. Прямые измерения определяют наличие самой воды либо посредством ее удаления, либо посредством химического взаимодействия. Использование термогравиметрического анализатора влажности – это способ прямого измерения влагосодержания в образце с использованием метода определения потери массы при высушивании (LOD).

При определении потери массы при высушивании по данному методу измеряют массу образца до и после процесса сушки. Разница между этими значениями используется для определения процентного содержания влаги, которое рассчитывается как отношение массы, удаленной за счет сушки, к исходной массе образца.

Обычно такое измерение проводится в сушильной печи с использованием весов для определения исходной и конечной массы образца, после чего простым математическим расчетом вычисляется влагосодержание [(исходная масса – конечная масса)/исходная масса]. На весь процесс обычно требуется несколько часов, а сам метод чувствителен к ошибкам пользователя. Анализатор влажности работает по такому же принципу, но представляет собой автоматизированную систему, в которой в одном устройстве объединены управляемый микропроцессором нагревательный элемент и анализатор. При использовании такого устройства содержание влаги в образце можно измерить за несколько минут, а не часов.

ГАЛОГЕННЫЕ И МЕТАЛЛИЧЕСКИЕ НАГРЕВАТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Термогравиметрические анализаторы влажности эффективно высушивают образец за счет передачи энергии как излучением (энергия в форме волн или частиц проходит сквозь среду, в данном случае – образец), так и конвекцией (перенос тепла за счет перемещения массы). Напротив, обычная сушильная печь для высушивания образца использует главным образом конвекцию. И металлические, и галогенные нагревательные элементы излучают энергию в инфракрасной области спектра. Инфракрасное (ИК) излучение — это часть электромагнитного спектра, расположенная между микроволновым диапазоном и видимым светом. Инфракрасные волны включают в себя тепловое излучение и имеют волновую частоту в диапазоне от 0,75 мкм (длинноволновый предел видимого красного света) до 1,5 мкм (граница микроволн). Инфракрасное излучение невидимо для человеческого глаза. Красный свет, который часто ассоциируется с инфракрасным нагревом, на самом деле является отраженным красным светом из видимой части спектра.

Некоторые анализаторы влажности используют металлический нагревательный элемент, который представляет собой просто кусок металла с низким сопротивлением, который превращает электричество в тепло. Такие нагреватели идеально подходят для условий, в которых присутствие стеклянных компонентов запрещено нормативными требованиями или по причинам безопасности (например, производство пищевых продуктов). Металлические нагреватели не идеальны, поскольку имеют очень большую теплоемкость и значительно дольше нагреваются, чем галогенные. Кроме того, ими труднее управлять и они не обеспечивают оптимальную воспроизводимость в анализаторе влажности. В галогенных излучателях используется вольфрамовый нагревательный элемент, заключенный в компактную стеклянную трубку, заполненную газообразным галогеном для защиты вольфрамового элемента. Такой галогенный излучатель испускает инфракрасное излучение в коротковолновом диапазоне 0,75–1,5 мкм. Компактная форма галогенного излучателя позволяет улучшить инерционность нагрева и охлаждения, уменьшить время достижения нагревательным элементом полной тепловой мощности и значительно сократить время, необходимое для завершения сушки образца. Кроме того, можно более точно управлять излучателем в процессе нагрева.



Рисунок 1. Быстрый нагрев сокращает время измерения. При использовании инфракрасного галогенного нагрева сушка образца начинается за считанные секунды и выполняется примерно на 40% быстрее, чем в традиционных методах инфракрасного нагрева. В результате увеличивается производительность и повышается эффективность лаборатории

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Отбор и подготовка образца оказывают большое влияние на результаты определения влагосодержания и их воспроизводимость. Отбор образцов может проводиться на производственной линии через определенные интервалы времени или из каждой партии, выпущенной в конкретный день.

Для обеспечения воспроизводимых результатов необходимы представительные пробы, содержащие гомогенную смесь анализируемого материала. Во многих системах влагосодержание в разных частях материала неодинаково. Например, поверхность и края могут содержать меньше влаги, чем внутренние части. Для получения представительной пробы материал следует перемешать до однородности и использовать порции этой смеси для анализа. Количество отобранного образца может влиять на результат определения влажности. Для получения надежного результата важно использовать соответствующее количество образца. Обычно рекомендуется использовать образец массой 5–10 г. Минимально допустимая масса составляет 0,5 г. Образцы малой массы следует использовать только в тех случаях, когда материал трудно получить или он дорогой.

Важно, чтобы образец был равномерно распределен по чашке для образца так, чтобы его физическое состояние позволяло поглощать ИК-излучение и рассеивать влагу. Хотя некоторые образцы можно сразу помещать в чашку, для улучшения процесса сушки иногда требуется изменить физическое состояние образца, например измельчить его или размолоть. Важно, чтобы во время этого процесса образец не набирал и не терял влагу. Внимательное планирование всех операций позволяет легко избежать изменения влагосодержания при подготовке образца.

Рекомендуется измерять образец сразу после его подготовки. Хранение образца в герметично закрытом контейнере также поможет предотвратить миграцию влаги до анализа и между различными испытаниями.

Количество и распределение образца

Количество образца, необходимое для анализа, определяется тем, как он будет распределяться в чашке, и содержанием в нем влаги. В зависимости от влагосодержания количество анализируемого образца может влиять на оптимизацию условий сушки и воспроизводимость результатов.

На результаты анализа также влияет распределение образца в чашке. В идеале образец должен быть распределен тонким, равномерным слоем по всей поверхности чашки. Образец может сгорать там, где его слой слишком тонкий, или удерживать влагу там, где слой слишком толстый. В обоих случаях изменятся достоверность и воспроизводимость результата определения влажности.



Рисунок 2. Примеры правильного и неправильного распределения образца в чашке

Использование стекловолоконных дисков

Стекловолоконные диски можно использовать в качестве инертной пористой подложки для анализа жидких образцов. Дозирование жидкости на стекловолоконный диск уменьшает поверхностное натяжение образца и увеличивает общую площадь поверхности, сокращая время анализа. Диски, которые используются для очень чувствительных измерений или научных исследований, можно хранить в эксикаторе, чтобы избежать влияния на результат определения влажности. (Для повседневных анализов это необязательно.)

Стекловолоконные диски можно также использовать с материалами, чувствительными к воздействию тепла, или материалами, которые при сушке образуют пленки. Использование диска в качестве верхнего слоя или размещение материала между двумя дисками (сэндвич) защищает образец от ИК-излучения. Образец можно высушить за счет обычного тепла, а не прямого воздействия ИК-излучения.

УСТАНОВКА И ПЕРВИЧНАЯ НАСТРОЙКА АНАЛИЗАТОРОВ ВЛАЖНОСТИ

Для обеспечения высокой воспроизводимости и точности результатов очень важно, чтобы анализатор влажности был установлен правильно. Поскольку изменение окружающих условий может негативно влиять на результаты измерений, анализатор влажности следует размещать в таком месте, где факторы окружающей среды (температура, влажность, вибрация и т.д.) наиболее стабильны.

Важно, чтобы анализатор влажности располагался в таких же условиях, в которых он был откалиброван, а температура во время анализа оставалась неизменной. Если условия эксплуатации изменяются, то для получения наилучших результатов необходимо выполнить повторную калибровку с использованием комплекта для калибровки по температуре.

ВЫБОР МЕСТА ДЛЯ УСТАНОВКИ

Физическое расположение

Как и любые весы, анализатор влажности должен располагаться на прочном столе, который не подвержен вибрации. Поверхность должна быть достаточно устойчивой, чтобы никакие вибрации не регистрировались как изменение массы. Следует учесть, что в устройстве есть вентилятор, который прогоняет поток окружающего воздуха через камеру для поддержания постоянной температуры датчика веса при нагревании. Для обеспечения нормального функционирования этого вентилятора анализатор влажности должен размещаться на открытом месте и на расстоянии от стены.

Для очень чувствительных образцов или для случаев, в которых очень важна точность показаний, можно установить анализатор в камере с искусственным климатом, где строго контролируется температура и влажность.

Температура

Изменение температуры и условий холодного запуска (состояние запуска анализатора влажности после некоторого периода простоя) может отрицательно влиять на результаты. В идеале должна поддерживаться температура 20 °C. После установки устройства температура должна быть постоянной, а устройство не должно размещаться в непосредственной близости от других объектов (включая окна), которые выделяют тепло. Рабочая температура никогда не должна превышать предельные значения, указанные в руководстве по эксплуатации или в листе технических данных.

Относительная влажность

Важно также избегать быстрых изменений влажности, которые могут влиять на датчик веса и вызывать дрейф, что может приводить к неверным результатам измерения. Относительная влажность должна быть около 50% и никогда не должна превышать предельные значения, указанные в руководстве по эксплуатации или в листе технических данных. После установки устройства относительная влажность должна поддерживаться постоянной.

Потоки воздуха

Как и любые весы, анализатор влажности должен располагаться в таком месте, где отсутствуют потоки воздуха. Это относится и к потокам воздуха, вызванным открытыми окнами или системами кондиционирования.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГОСОДЕРЖАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛИЗАТОРА ВЛАЖНОСТИ OHAUS[1]

Анализаторы влажности серии MB компании OHAUS основаны на технологии галогенного нагрева (за исключением модели MB23, в которой используется металлический нагревательный элемент). Эти приборы могут использоваться для измерения влагосодержания в самых разных материалах.

Что такое метод?

Метод – это набор параметров, который определяет, каким образом высушивается образец. Метод состоит из программы сушки, температур, критерия выключения и других параметров, которые определяют, как отображаются результаты (например, единицы измерения). Пользователь может определить наилучший метод сушки, который дает необходимый результат.

Достоверность и точность

Достоверность – это характеристика измерения, отражающая близость измеренного значения к фактическому или истинному значению. Точность – это характеристика измерения, отражающая близость измеренных значений друг к другу. Обычно определяется стандартным отклонением серии измеренных значений. Важно отметить, что анализатор влажности должен быть точным: несколько образцов, измеренных в одинаковых условиях, должны давать совокупность результатов с очень маленькой дисперсией. Пользователь должен выбрать метод и подготовить образец так, чтобы обеспечить достоверность.



Рисунок 3. Пример достоверного и точного распределения измеренных значений

Параметры метода

Температура сушки

Анализаторы влажности серии MB (в зависимости от модели) имеют широкий диапазон температур сушки. Хотя в режиме сушки можно выбрать темпера-

[1] Несмотря на то, что в качестве примера рассматривается анализатор влажности MB120 компании OHAUS, описанные принципы применимы к любому термогравиметрическому анализатору влажности.

туру в диапазоне от 40 до 230 °С, большинство образцов измеряется при температуре в диапазоне от 100 до 140 °С.

Программы сушки

Влагосодержание (ВС) сильно зависит от температуры сушки, использующейся для удаления влаги. Чрезмерный нагрев может приводить к высокому значению влагосодержания из-за разложения образца или изменения химического строения. Если программа сушки слишком агрессивная, то показания искусственно завышаются, а результаты очень трудно воспроизвести. И наоборот, более низкие уровни нагрева могут сохранить целостность образца, но увеличивают время сушки, делая испытание невыгодным для использования в производственных условиях.

Анализаторы влажности серии MB предлагают серию программ сушки, которые позволяют пользователю настроить профиль сушки для конкретного образца. За счет индивидуальной настройки программы можно оптимизировать измерения влажности так, чтобы улучшить условия сушки, сократить время анализа и вместе с тем минимизировать разложение образца или изменение химического строения. Таким образом улучшаются достоверность и воспроизводимость результатов испытания. Путем определения целевой температуры можно настроить четыре температурные программы: стандартную, ускоренную, ступенчатую и линейную.

Стандартная

Стандартная программа сушки наиболее распространена и подходит для большинства образцов. В этой программе задается целевая температура, которая поддерживается постоянной до конца измерения.

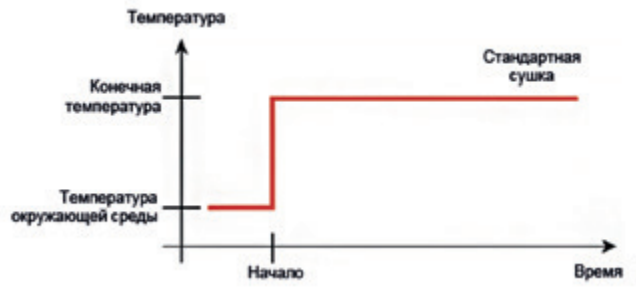


Рисунок 4. Стандартная программа сушки

Ускоренная

Ускоренная программа сушки пригодна для образцов с более высоким влагосодержанием, поскольку она основывается на высвобождении только доступной влаги и предотвращает обугливание образца. В этой программе температура поднимается выше целевого значения на 40% в течение первых 3 мин, а затем возвращается к целевой температуре, которая поддерживается постоянной до конца измерения.

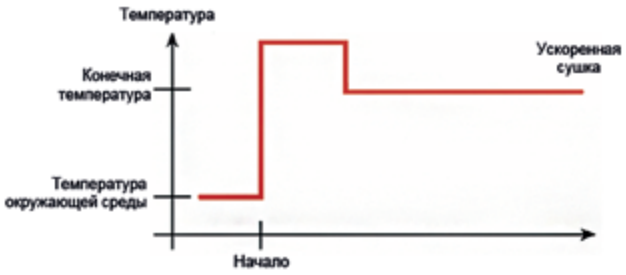


Рисунок 5. Ускоренная программа сушки

Ступенчатая

Ступенчатая программа сушки позволяет поддерживать постоянными несколько температур в течение определенных периодов времени, обеспечивая более строгий температурный контроль. Эта программа может быть полезна для анализа, в котором сначала используется более низкая температура для высушивания и измерения поверхностной влаги, а затем более высокая температура – для высвобождения и измерения связанной влаги. Или же сначала может использоваться более высокая температура для выжигания летучих растворителей, а затем более низкая – для измерения влагосодержания.

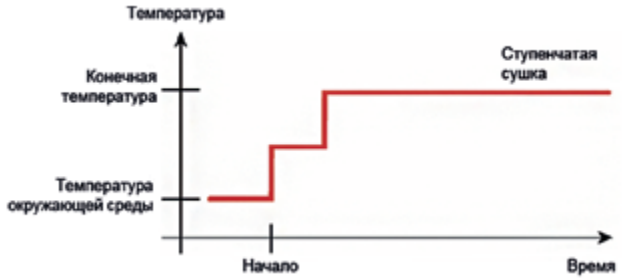


Рисунок 6. Ступенчатая программа сушки

Линейная

Линейная программа сушки позволяет постепенно повышать температуру в течение некоторого периода времени. Это может быть полезным для сушки вещества с высоким содержанием сахара, когда медленное линейное повышение температуры позволяет постепенно испарять связанную воду до образования карамелизованного слоя, под которым удерживается связанная вода.

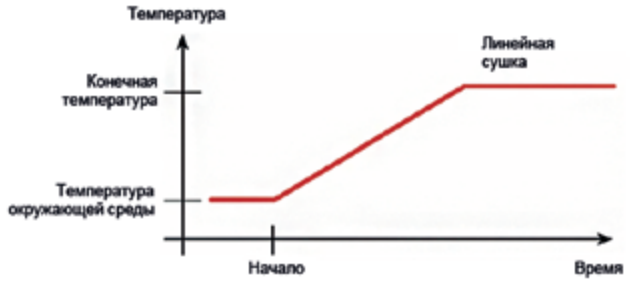


Рисунок 7. Линейная программа сушки

Критерий выключения

Критерий выключения определяет момент, когда анализатор влажности прекращает нагрев и считает, что измерение завершено. Это можно сделать либо вручную, либо с помощью нескольких встроенных опций для обеспечения достоверных, воспроизводимых результатов. Момент и порядок остановки программы нагрева можно запрограммировать в соответствии с планом выполнения анализа или условиями установившейся массы. Для анализаторов серии MB доступны следующие критерии выключения.

1. **Manual (Вручную)** — пользователь сам определяет конец измерения и выключает прибор.
2. **Timed (По времени)** — прибор выключается автоматически через заданный интервал времени (например, 10 мин).
3. **Auto (Авто)** — прибор выключается автоматически в зависимости от значения потери массы в единицу времени. Для встроенных критериев автоматического выключения конец измерения достигается, когда наблюдаемое общее изменение массы составляет менее 1 мг за определенный период времени. Варианты выбора:

- A30 = потеря массы менее 1 мг за 30 с (быстро высушиваемые образцы или быстрые измерения).
- A60 = потеря массы менее 1 мг за 60 с (большинство образцов).
- A90 = потеря массы менее 1 мг за 90 с (медленно высушиваемые образцы).

4. **AFREE** — настраиваемое пользователем автоматическое выключение. Позволяет определить критерий выключения в соответствии с потерей массы за единицу времени.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦА И РАЗРАБОТКА МЕТОДА

Анализаторы влажности серии MB компании OHAUS можно использовать для анализа самых разных материалов: приборы предоставляют широкий выбор опций (температуры, программы сушки, критерии выключения), которые можно использовать для создания оптимального метода для анализа конкретного вещества. Однако создание такого метода может быть непростой задачей, и поэтому при разработке метода рекомендуется уделить достаточно времени для проведения экспериментов.

При разработке и оптимизации протокола испытания важно понимать природу анализируемого материала. Перед началом работы необходимо рассмотреть следующие три фактора.

Приблизительное влагосодержание	• Определенное на основании данных в специальной литературе • Рассчитанное из исходных ингредиентов • Оцененное путем сравнения с родственными материалами
Чувствительность к теплу	• Наличие летучих компонентов, помимо воды • Наличие горючих компонентов • Параметры горения образца
Физическое состояние образца	• Свойства поверхности, повышенное поглощение ИК-излучения • Равномерное распределение образца для нагрева • Повышенная теплопроводность • Способность к рассеиванию тепла и влаги с поверхности

Наиболее распространенный способ разработки метода для конкретного вещества – это получение эталонного значения, а затем создание метода для воспроизведения целевого значения за максимально короткое время сушки. Для получения эталонного значения рекомендуется использовать метод определения потери массы при высушивании (LOD), анализатор и сушильную печь. Или можно использовать эксикатор (sicco), титратор по Карлу Фишеру (Metrohm серии KF) или другие методы.

После получения эталонного значения можно приступить к разработке соответствующего метода на анализаторе влажности. Рекомендуется подготовить образец и высушить его при оптимальной теоретической температуре, а затем проанализировать получившуюся кривую сушки.

Например,

- стандартная программа сушки при 120 °C;
- критерий выключения: A60.

Интерпретация полученной кривой сушки поможет определить подходящие условия анализа для конкретного образца. Асимптотические кривые сушки характерны для образцов, которые во время сушки достигают постоянного значения влажности. Оптимизация температурного профиля и критерия выключения обычно не вызывает трудностей и приводит к воспроизводимым результатам.

В приведенном примере (рисунок 8) образец достигает установившейся массы, и выполняется критерий автоматического выключения. Если достигнутое конечное значение ниже, чем ожидаемое, это указы-



Рисунок 8. Изображение асимптотической кривой, установившаяся масса

вает, что температура недостаточно высока, чтобы высвободить всю связанную влагу. Следует повысить температуру и повторить измерение, пока не будет достигнута оптимальная температура. И наоборот, если результирующее значение слишком высокое, это может означать, что состав образца изменяется (образец сгорает). Следует понизить температуру и повторить измерение. Важно визуально проверить образец на наличие признаков горения или обугливания.

В других случаях образцы могут так и не достигнуть постоянной массы на всем протяжении процесса сушки. Профиль сушки тогда приближается к графику, показанному на рисунке 9. Этот тип кривой характерен для образца, претерпевающего термическое разложение или непрекращающееся испарение летучих компонентов. Оптимизация в этом случае может потребовать снижения температурного профиля, использующегося для сушки. Выключение по времени и постоянная исходная масса образца также помогают улучшить воспроизводимость.

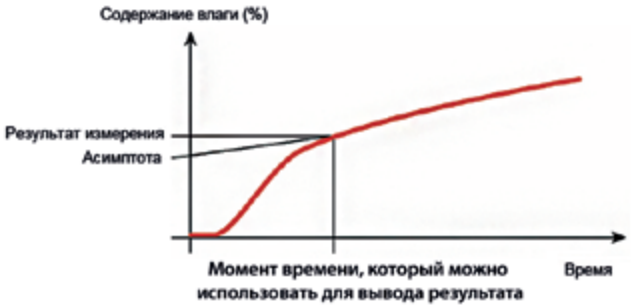


Рисунок 9. Изображение кривой сушки, которая не достигает установившейся массы

В некоторых случаях может потребоваться определить влагосодержание только с использованием анализатора влажности (то есть эталонное значение отсутствует или не может быть измерено). В таких случаях разработку метода следует выполнять, как описано выше, с целью достижения максимально короткого времени сушки и наиболее воспроизводимых результатов. Для определения и подтверждения правильности метода необходимо выполнить несколько измерений. Следует отметить, что в этом случае результат может не отражать фактическое содержание влаги, однако его можно использовать как приблизительный критерий оценки (хотя конечное значение не показывает точное содержание влаги, по нему можно судить об отклонениях в действительном влагосодержании образца).

Соответствие анализатора влажности требованиям GLP/ISO

Для поддержания конкурентоспособности большинство компаний уделяют огромное внимание контролю качества, а анализатор влажности играет важную роль в системе контроля качества. Анализатор MB120 компании OHAUS предназначен либо для простой интеграции в общую систему управления качеством согласно GLP или GMP, либо для внедрения в организацию как части стандарта, такого как ISO 9000. В соответствии с требованиями GLP и стандартов ISO необходима прослеживаемая документация для всех процедур калибровки и регулировки, а также испытаний, которые выполняются на измерительном приборе.

Взвешивающий компонент любого анализатора влажности можно отрегулировать в соответствии с процедурой, изложенной в руководстве по эксплуатации, и с использованием сертифицированной гири.

Нагревающий компонент или компонент измерения температуры можно также отрегулировать с использованием специальной процедуры, разработанной для анализаторов влажности. Нагревательный элемент можно отрегулировать в соответствии с процедурой, описанной в руководстве по эксплуатации. Эту процедуру можно выполнять с использованием калиброванного термометра и, таким образом, гарантировать, что влагосодержание будет определяться в одинаковых условиях независимо от места установки прибора.

Документирование процедуры осуществляется с использованием программного обеспечения прибора и подключенного принтера.

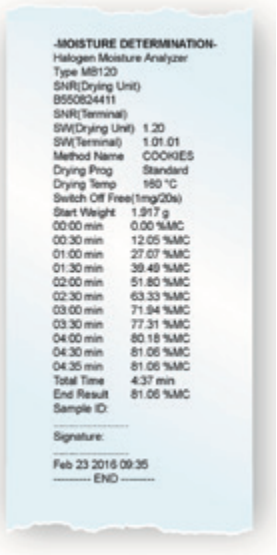

-MOISTURE DETERMINATION-
Halogen Moisture Analyzer
Type MB120
SNR(Drying Unit)
B550824411
SNR(Terminal)
SW(Drying Unit) 1.20
SW(Terminal) 1.01.01
Method Name COCKIES
Drying Prog Standard
Drying Temp 160 °C
Switch Off Free(1mg/20s)
Start Weight 1.917 g
00:00 min 0.00 %MC
00:30 min 12.05 %MC
01:00 min 27.07 %MC
01:30 min 39.49 %MC
02:00 min 51.80 %MC
02:30 min 63.33 %MC
03:00 min 71.94 %MC
03:30 min 77.31 %MC
04:00 min 80.18 %MC
04:30 min 81.06 %MC
04:35 min 81.06 %MC
Total Time 4:37 min
End Result 81.06 %MC
Sample ID:
Signature:
Feb 23 2016 09:36
END

Рисунок 10. Пример распечатки после завершения испытания

ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАКОНЕЧНИКОВ LOW RETENTION GRIPTIP ОТ INTEGRA ДЛЯ ПИПЕТОК-ДОЗАТОРОВ

Материал предоставлен компанией INTEGRA

ВВЕДЕНИЕ

Точность и прецизионность имеют первостепенное значение при пипетировании в различных сферах применения. Неоднократно было доказано, что наилучшие результаты достигаются только в случае следования рекомендуемой технике пипетирования и использования оптимизированной системы, в которой наконечники и пипетки идеально подходят друг другу.

Особое внимание необходимо уделять природе дозируемой жидкости и ее физико-химическим свойствам. Если стандартные наконечники из полипропилена обеспечивают идеальную точность, прецизионность и полную эвакуацию жидкости в случае работы с водой, это вовсе не означает, что при работе с другими субстанциями удастся достичь подобных результатов.

Дело в том, что жидкости, содержащие детергенты и другие растворы с низким поверхностным натяжением, образуют тонкую пленку на внутренней поверхности наконечников пипетки, что приводит к неточному, невоспроизводимому дозированию и, что еще хуже, потере дорогостоящих и ценных реагентов и образцов.

Для решения данной проблемы INTEGRA разработала наконечники Low Retention GripTip, которые предотвращают образование пленки на внутренней поверхности наконечника и обеспечивают полную эвакуацию жидкости из наконечника при работе с образцами с низким поверхностным натяжением, что гарантированно приводит к получению лучших результатов.

В данной статье описаны преимущества использования наконечников Low Retention GripTip при дозировании жидкостей с низким поверхностным натяжением.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПОЧЕМУ СТОИТ ИСПОЛЬЗОВАТЬ НАКОНЕЧНИКИ LOW RETENTION ВМЕСТО СТАНДАРТНЫХ?

Полипропилен (PP) – наиболее подходящий материал для производства наконечников для пипеток ввиду его гидрофобных свойств и низкой поверхностной энергии. Жидкости с повышенным поверхностным натяжением, например вода, обладают низкой смачиваемостью по отношению к полипропилену, поскольку взаимодействие между молекулами жидкости (рисунок 1а, синие стрелки) сильнее сил взаимодействия между жидкостью и поверхностью полипропилена. В результате жидкость образует каплю, которая затем отталкивается поверхностью (рисунок 1а). И напротив, жидкости с пониженным поверхностным натяжением или слабыми силами взаимодействия внутри жидкости, например оливковое масло, хорошо смачивают полипропилен. В результате жидкость растекается по поверхности полипропилена (рисунок 1б).

Таким образом, дозирование воды с помощью стандартных полипропиленовых наконечников является оптимальным решением, поскольку вода плохо смачивает наконечник и хорошо эвакуируется из наконечника.

Однако зачастую приходится работать с вязкими образцами, детергентами и другими жидкостями с низким поверхностным натяжением, которые образуют тонкую пленку на внутренней поверхности наконечника (рисунок 1в). Данное явление приводит к возникновению неточностей при дозировании и нередко к потере дорогостоящих реагентов.

Данная проблема является крайне актуальной для различных областей, например при культивировании клеток, клонировании, секвенировании ДНК, проведении анализов методом ПЦР или электрофореза в полиакриламидном геле, анализе белка. Проблема может встречаться и на других этапах пипетирования при работе с вязкими жидкостями, обладающими низким поверхностным натяжением, такими как трис, твин, изопропанол, мастер-микс, Тритон X-100, додецилсульфат натрия, цельная кровь, плазма и т.п.

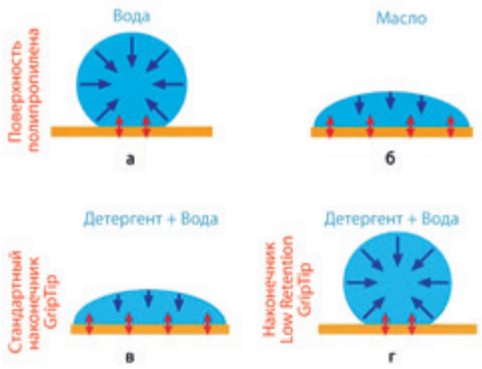


Рисунок 1. Силы взаимодействия внутри жидкости и между жидкостью и поверхностью в четырех различных конфигурациях (1а, 1б, 1в и 1г).

а – Плохое смачивание. Поверхность не смачивается жидкостью, образуется капля; б – Хорошее смачивание. Масло обладает хорошей адгезией к поверхности и образует тонкую пленку; в – Хорошее смачивание. Образование тонкой пленки на внутренней поверхности наконечника; г – Плохое смачивание. Поверхность не смачивается жидкостью, образуется капля

Решение данной проблемы заключается в замене материала наконечника на тот, который обладает низкой поверхностной энергией и адгезией к жидкостям с низким поверхностным натяжением. Наконечники Low Retention GripTip изготовлены из такого материала, который предотвращает формирование пленки на внутренней поверхности наконечника, способствуя оптимальной эвакуации жидкости из пипетки (рисунок 1г).

Производители наконечников Low Retention, как правило, используют либо силиконовое покрытие для внутренней поверхности наконечника, либо материалы с полипропиленом.

Полипропилен предпочтительнее силиконового покрытия, которое может попадать в образец, приводя к искажению результатов.

Компания INTEGRA применяет специально разработанный состав материала с использованием полипропилена для производства наконечников Low Retention GripTip с высокими гидрофобными свойствами.

НАКОНЕЧНИКИ LOW RETENTION GRIPTIP И СТАНДАРТНЫЕ НАКОНЕЧНИКИ GRIPTIP

Наконечники пипеток GripTip были разработаны специально для ручных и электронных пипеток INTEGRA и образуют идеальную систему пипетирования. Установка наконечника GripTip требует минимальных усилий, при этом обеспечивается надежная фиксация наконечника на пипетках. Наконечник GripTip не спадает в ходе работы и идеально прилегает к пипетке, что является гарантией высокой точности и прецизионности полученных результатов.

Для работы с вязкими жидкостями с низким поверхностным натяжением INTEGRA разработала специальные наконечники Low Retention GripTip, которые по аналогии с наконечниками GripTip для дозирования жидкостей на водной основе обеспечивают получение точных и прецизионных результатов.

При сравнении применения 12-канальной электронной пипетки VIAFLO II на 300 мкл с наконечниками Low Retention GripTip и GripTip для дозирования концентрированного зеленого красителя наглядно видно преимущество использования наконечников Low

Retention GripTip. На рисунке 2 изображены стандартные наконечники GripTip (слева) и наконечники Low Retention GripTip (справа).



Рисунок 2. Дозирование концентрированного зеленого красителя с помощью 12-канальной электронной пипетки VIAFLO II на 300 мкл с 6 стандартными наконечниками GripTip (слева) и 6 наконечниками Low Retention GripTip (справа)

СРАВНЕНИЕ ОБЪЕМОВ ОСТАТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ В НАКОНЕЧНИКАХ

Для подтверждения эффективности использования наконечников Low Retention GripTip в сравнении со стандартными наконечниками GripTip была проведена серия экспериментов в лаборатории с контролируемыми условиями. Было выполнено сравнение остаточной жидкости при использовании обоих типов наконечников при дозировании жидкости с низким поверхностным натяжением. Измерения проводились с помощью гравиметрического метода.

В первой серии тестов была выполнена оценка эффективности стерильных наконечников Low Retention GripTip на 300 мкл в сравнении со стандартными наконечниками GripTip того же объема при дозировании трех одинаковых жидкостей с низким поверхностным натяжением: 10% твин-20 в дистиллированной воде, 10% додецилсульфат натрия в дистиллированной воде и 80% изопропанол в дистиллированной воде. Дозирование проводилось с использованием одноканальной электронной пипетки VIAFLO II на 300 мкл по следующей схеме: пипетку полностью заполняли при скорости 5, а затем опорожняли при скорости 2. Результаты были получены путем дифференциального взвешивания тестируемых наконечников. Для получения более точных результатов каждое взвешивание повторялось 10 раз на один исследуемый раствор и тип наконечника.

На рисунке 3 представлены результаты для трех тестируемых растворов с указанием среднего объема остаточной жидкости и погрешности измерения для каждого типа наконечника.

Также был произведен расчет процентного значения остаточной жидкости от общего объема отобранной и дозируемой жидкости для каждого раствора и типа наконечника GripTip. Благодаря этому удалось достичь более глубокого понимания свойств тестируемых наконечников Low Retention GripTip в сравнении с их стандартной версией.

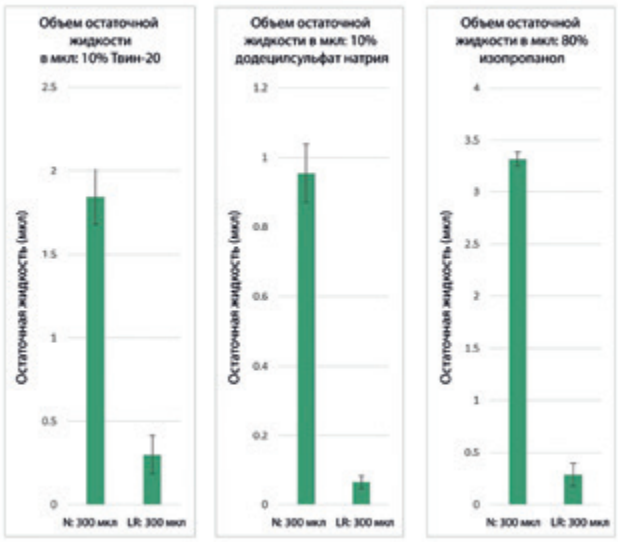


Рисунок 3. Среднее значение количества остаточной жидкости в наконечнике и погрешность измерения при работе с 10% твин-20 (слева), 10% додецилсульфатом натрия (в центре) и 80% раствором изопропанола (справа) с использованием стандартных наконечников GripTip (N) и стерильных наконечников Low Retention GripTip (LR), объем дозирования 300 мкл

Полученные значения (представлены в таблице 1) наглядно подчеркивают преимущества применения наконечников Low Retention GripTip для работы с жидкостями с низким поверхностным натяжением, демонстрируя более полное опорожнение пипеток при тестировании нескольких различных жидкостей в сравнении со стандартным типом наконечников GripTip.

В ходе первой серии экспериментов было продемонстрировано преимущество использования наконечников Low Retention GripTip при дозировании стандартных растворов с низким поверхностным натяжением: существенно снизился объем остаточной жидкости, при этом полученные результаты демонстрируют хорошую воспроизводимость. Таким образом, новая разработка компании INTEGRA является идеальным решением для точного дозирования жидкостей с низким поверхностным натяжением, гарантируя максимальное опорожнение наконечника.

Таблица 1.

Объемы остаточной жидкости (в мкл), представленные в процентах от общего объема, дозируемого с помощью стандартных наконечников GripTips (N) и стерильных наконечников Low Retention GripTips (LR) на 300 мкл

	N 300 мкл	LR 300 мкл
10% твин-20	0,62%	0,10%
10% додецилсульфат натрия	0,32%	0,02%
80% изопропанол	1,11%	0,10%

Примечание: Тестируемые растворы: 10% твин-20, 10% додецилсульфат натрия и 80% изопропанол в воде.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НАКОНЕЧНИКОВ LOW RETENTION GRIPTIP ДЛЯ ПИПЕТОК РАЗНОГО ОБЪЕМА

Вторая серия экспериментов была проведена с наконечниками различного объема: 12,5; 125; 300 и 1250 мкл.

Было выполнено сравнение остаточного объема жидкости в стандартных наконечниках и наконечниках Low Retention GripTip после дозирования полного объема 10% раствора твин-20 в дистиллированной воде. Одноканальные электронные пипетки VIAFLO II различных объемов были протестированы по той же схеме, что и в первой серии экспериментов. Для подтверждения точности и воспроизводимости полученных результатов все измерения повторялись по 12 раз для каждого объема.

На рисунке 4 представлены средние объемы остаточной жидкости в мкл и погрешности измерения для четырех наконечников GripTip стандартного типа и наконечников Low Retention разного объема.

Диаграммы показывают эффективность наконечников Low Retention GripTip в сравнении со стандартными наконечниками разного объема.

В таблице 2 указаны объемы остаточной жидкости в процентах от общего дозируемого объема. Для всех объемов наконечников наблюдалось значительное уменьшение объема остаточной жидкости при использовании наконечников Low Retention GripTip при сравнении с наконечниками GripTip.

Полученные результаты наглядно демонстрируют эффективность применения наконечников Low Retention GripTip вне зависимости от их размера и формы. Наконечники Low Retention GripTip являются отличным решением для максимально точного дозирования жидкостей с низкой поверхностной энергией.

Таблица 2.

Объемы остаточной жидкости (в мкл) в процентах от общего объема, дозируемого с помощью стандартных наконечников GripTip (N) и стерильных наконечников Low Retention GripTips (LR) разного объема

	N	LR
12,5 мкл	0,60%	0,13%
125 мкл	0,65%	0,10%
300 мкл	0,62%	0,10%
1250 мкл	0,94%	0,30%

Примечание: Тестируемые объемы: 12,5; 125; 300 и 1250 мкл. Тестируемый раствор: 10% твин-20 в дистиллированной воде.

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ

Влияние поверхностного натяжения, как правило, оценивается путем тестирования разных концентраций изопропанола (iPrOH) в воде. Данный спирт имеет низкое поверхностное натяжение (23 мн/м при 20 °C) по сравнению с водой (72,80 мн/м при 20 °C). Для получения растворов с различным поверхностным натя-

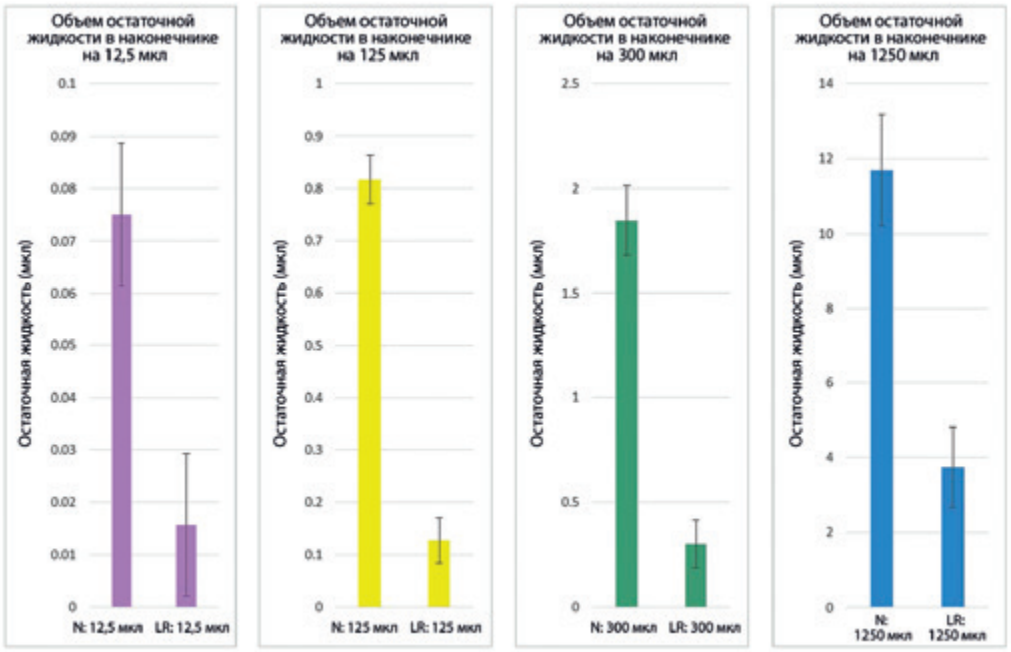


Рисунок 4. Сравнение объемов остаточной жидкости в стандартных наконечниках GripTip (N) и стерильных наконечниках Low Retention GripTip (LR) различного объема после дозирования раствора 10% твин-20 в дистиллированной воде: средние значения объема жидкости даны в мкл, также представлены погрешности измерений (количество тестируемых наконечников: по 12 наконечников каждого типа)

жением необходимо изменить соотношение изопропанола и воды.

Данное исследование было выполнено с целью изучения эффективности применения наконечников Low Retention GripTip при работе с жидкостями с разным поверхностным натяжением, также было выполнено сравнение полученных результатов с результатами тестирования наконечников GripTip.

Было выполнено сравнение стандартных наконечников GripTip и стерильных наконечников Low Retention GripTip с использованием одноканальной электронной пипетки VIAFLO II. Используемые растворы: 0, 20, 40, 60 и 80% изопропанола в дистиллированной воде. Объемы остаточной жидкости в наконечниках измерялись гравиметрическим способом. Для каждого типа наконечников эксперимент повторялся 10 раз с целью получения качественных и воспроизводимых результатов

Результаты данной серии экспериментов показаны на рисунке 5. При использовании стандартных наконечников GripTip наблюдалось сильное влияние поверхностного натяжения жидкости на количество остаточной жидкости в наконечнике, максимальный объем остаточной жидкости достигал 2,78 мг при дозировании раствора 80% изопропанола в воде. В

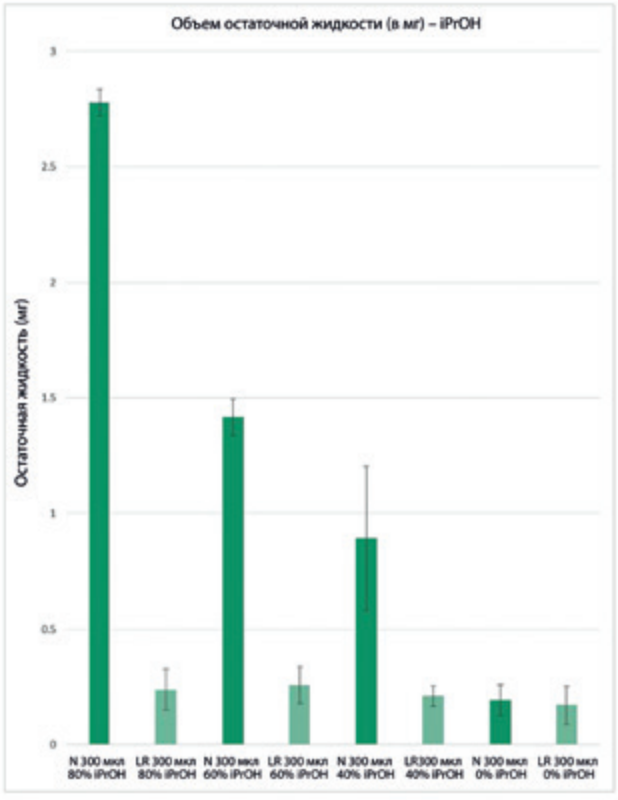


Рисунок 5. Сравнение объемов остаточной жидкости в стандартных наконечниках GripTip на 300 мкл (N, темно-зеленые столбцы) и стерильных наконечниках Low Retention GripTip на 300 мкл (LR, светло-зеленые столбцы) при дозировании различных концентраций изопропанола в воде. Расчет погрешностей основан на 10 измерениях

случае использования наконечников Low Retention GripTip максимальный объем остаточной жидкости составлял 0,26 мг. Полученные результаты дозирования растворов с низким поверхностным натяжением ясно подчеркивают преимущество использования наконечников Low Retention GripTip перед стандартными наконечниками GripTip.

При увеличении содержания изопропанола в воде от 0 до 20% эффективность стандартных наконечников GripTip уменьшалась. Результаты тестирования наконечников Low Retention GripTip были близки друг к другу при низких концентрациях изопропанола. Данный результат легко объясняется тем, что разность энергий между жидкостью и полипропиленом достаточно высокая, что приводит к формированию капель жидкости на поверхности полипропилена и способствует лучшему опорожнению пипетки. Таким образом, преимущество наконечников Low Retention GripTip над стандартными GripTip уменьшается при дозировании жидкостей с высоким поверхностным натяжением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Точность дозирования жидкости в мкл зависит от нескольких факторов, которые необходимо выявить и в дальнейшем тщательно контролировать для получения точных и воспроизводимых результатов.

Для решения данных проблем были разработаны методики пипетирования, а также системы дозирования, в которых наконечники и пипетки идеально прилегают друг к другу. Однако стандартные наконечники, изначально созданные для дозирования растворов на водной основе, оказываются неэффективными при дозировании жидкостей с низким поверхностным натяжением.

INTEGRA предлагает решения для ручного и электронного дозирования как жидкостей с низким, так и высоким поверхностным натяжением.

В данной статье наглядно продемонстрированы преимущества применения наконечников Low Retention GripTip над стандартными GripTip при дозировании жидкостей с низким поверхностным натяжением.

Таким образом, применение наконечников Low Retention GripTip совместно с пипетками INTEGRA позволяют получить наилучшие результаты дозирования в различных областях применения.

INTEGRA

КАК ИЗБЕЖАТЬ ПРОБЛЕМ СО СКЛЕИВАНИЕМ И ЗАЛИПАНИЕМ ПРИ ПРЕССОВАНИИ ТАБЛЕТОК?

АВТОР

Ч. Кеттлер,
директор Natoli Scientific, PhD

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы склеивания и залипания таблеток довольно распространены в сфере их производства. В сфере производства лекарственной продукции часто встают вопросы о необходимости срочной разработки новых молекул. Однако подобная срочность может привести к принятию поспешных решений о запуске клинических испытаний, что в конечном итоге приведет к появлению проблем при масштабировании этапа формования таблетки.

В процессе разработки твердых лекарственных форм для орального применения часто игнорируют некоторые, на первый взгляд кажущиеся незначительными, детали. В последующем это может приводить к появлению дефектов таблеток на этапе их формования при масштабировании производства до коммерческого масштаба. Для повышения узнаваемости таблеток им стараются придать определенную форму или нанести логотип компании-производителя, что приводит к существенному усложнению производственного процесса в период постмаркетингового распространения лекарственного препарата. Производителям оснастки для пресс-инструментов зачастую удается предсказать возникновение возможных проблем со склеиванием и залипанием таблеток еще до начала их коммерческого производства, что позволяет предотвратить возникновение множества неприятных ситуаций как среди производителей фармацевтических препаратов, так и оснастки для пресс-инструментов.

Проблемы склеивания и залипания, как правило, возникают вследствие наличия ошибок при разработке состава или геометрии таблетки, связанных с различиями в физических свойствах вспомогательных веществ и лекарственной субстанции. После смешивания всех ингредиентов таблетки образуется порошок, который либо затвердеет, либо нет на этапе формования таблетки.

Поскольку проблема с плохой прессуемостью порошков – это отдельная тема, то в данной статье мы рассмотрим примеры порошков, которые обладают достаточной прессуемостью.

КОГЕЗИОННАЯ ПРОЧНОСТЬ: ФОРМОВАНИЕ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Формование – результат химических дисперсионных и механических сил, соединяющих частицы, образующие твердое вещество с определенной плотностью и пористостью. Когезионные силы, связывающие частицы, можно оценить путем проведения ряда исследований с целью предсказания возникновения определенных проблем при прессовании таблеток [1]. Профиль прессумости и возможность масштабирования процесса являются крайне важными темами для научно-технических разработок. Данные исследования позволяют повысить успешность масштабирования процесса и возможности его технической реализации.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Частицы таблеток связываются благодаря когезионным силам. Однако в процессе прессования когезионные силы, связывающие частицы, нарушаются под воздействием пуансона. Как следствие, частички таблетки приклеиваются к прессующему элементу. Ранее было рассмотрено, что это связано в первую очередь с физическими свойствами активного фармацевтического ингредиента (АФИ), а механизм и кинетика данного процесса могут быть смоделированы [2].

Прилипание частичек таблетки к пресс-форме при нанесении букв и символов называется залипанием. Залипание, как правило, возникает как следствие ошибок, допущенных на этапе разработки дизайна таблетки. Проблемы с залипанием зачастую можно решить уже на этапе производства, но их крайне трудно предсказать и обнаружить до момента трансфера технологии на производственную площадку. Среди основных источников проблемы прилипания можно выделить выбор несоответствующего шрифта и гравировки.

ПРОСТЫЕ СПОСОБЫ УМЕНЬШИТЬ СКЛЕИВАНИЕ И ЗАЛИПАНИЕ

Предотвращение склеивания и залипания не всегда означает смену инструмента, используемого для производства таблеток. Когда порошок прилипает к выгравированным буквам, первое, что нужно проверить, – уровень влажности при формовании. Избыточная влажность при формовании и влага на пресс-инструменте могут вызвать залипание. Недостаточное усилие прессования также является потенциальной причиной залипания, поскольку порошок уплотняется не полностью. Это значит, что адгезионные силы легко преодолевают когезионные силы спрессованной несоответствующим образом таблетки.

Другое возможное решение проблемы – уменьшение количества смазывающего вещества, используемого при формовании таблетки. Это обеспечит лучшее отделение таблетки от поверхности пуансона. Также необходима тщательная проверка пуансона во избежание царапин на его поверхности, которые могут захватывать мелкие частицы. При избыточной влажности гранулята подобные царапины приводят к образованию пленки и небольшому склеиванию. При выявлении царапин на поверхности необходимо отшлифовать пресс-инструмент. Применение специальных паст для полировки в конечном итоге позволяет существенно улучшить свойства готового продукта.

СНИЖЕНИЕ ЗАЛИПАНИЯ ПУТЕМ ЗАМЕНЫ ШРИФТА

Если простых действий, упомянутых выше, недостаточно, необходим полный редизайн таблетки и инструмента. Прежде всего это касается выбора шрифта. Зачастую при выборе шрифта руководствуются его формой, а не функциональностью. Чрезмерно украшенный и сложный шрифт, зачастую приводит к залипанию и деформированию таблеток.

На рисунке 1 изображен сложный шрифт. Сложные шрифты, а также лишние декоративные элементы препятствуют достаточной прессовке порошка, приводят к отделению отдельных частичек от спрессованной таблетки и его прилипанию к пресс-инструменту, что показано на рисунке с помощью закрашенных зон.



Рисунок 1. **Непрактичный шрифт**

На рисунке 2 изображена та же печать, выполненная более практичным шрифтом с увеличенными буквами и радиусом закругления углов. Смена шрифта сводит к минимуму вероятность залипания при прессовке порошка и не приводит к разрушению когезионных сил таблетки.



Рисунок 2. **Более простой, но практичный шрифт**

СМЕНА ТЕХНИКИ НАНЕСЕНИЯ ГРАВИРОВКИ НА КЛИШЕ

Кроме смены шрифта, следует обратить внимание на технику гравировки. На рисунке 3 изображена стандартная круглая таблетка. На ней выгравирована циф-

ра «9» со стандартной шириной, глубиной гравировки и углами 35 градусов. Для большинства составов таблетки подобная гравировка не приведет к залипанию. Однако довольно часто встречаются нестандартные составы таблеток и подобные проблемы не редкость.

Чтобы устранить проблемы с прилипанием материала к центру цифры «9» (рисунок 3), можно использовать метод снижения глубины гравировки или pre-pick. На рисунке 4 глубина гравировки в центральной части цифры «9» уменьшена с 0,33 мм до 0,17 мм. Глубина гравировки может быть уменьшена на 10–100% в зависимости от степени выраженности проблемы с прилипанием. Стоит принимать во внимание, что снижение глубины гравировки приводит к уменьшению четкости символов и логотипа на таблетке, что является принципиально важным моментом с точки зрения узнаваемости бренда. Метод pre-pick применим к любой букве или цифре с полностью закрытыми зонами.

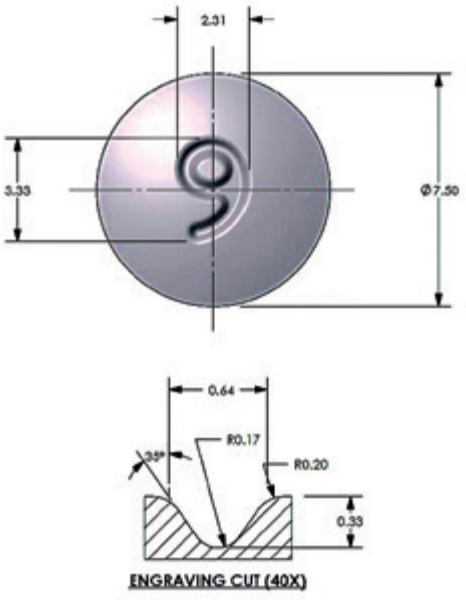


Рисунок 3. Круглая таблетка с цифрой «9»

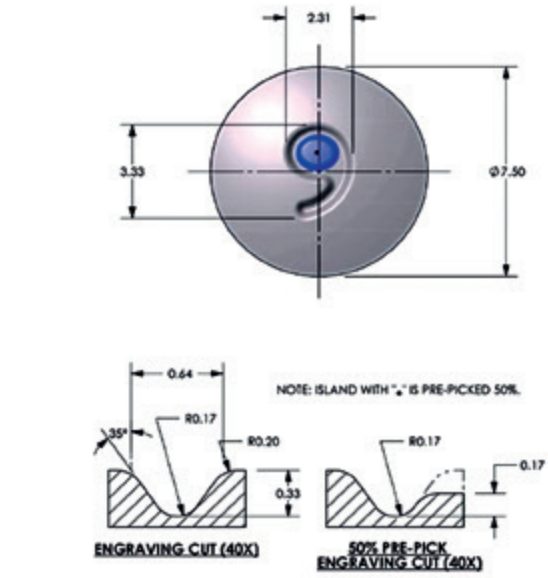


Рисунок 4. Снижение глубины гравировки центральной части таблетки

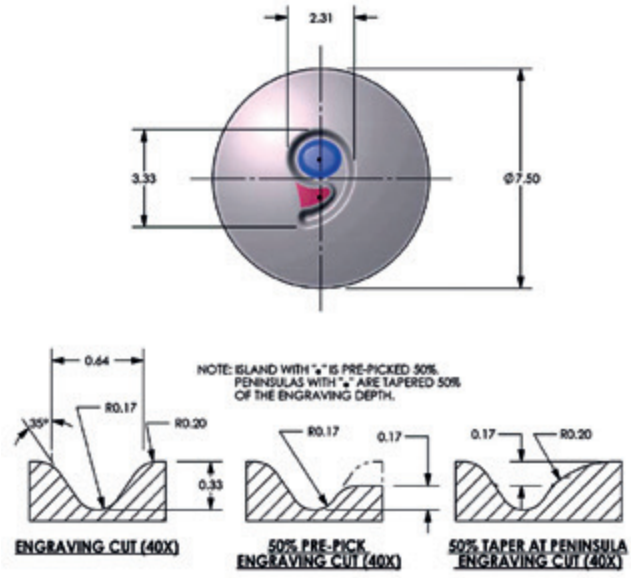


Рисунок 5. «Сглаживание» закрытой части таблетки со снижением глубины гравировки на 50%

При гравировке других сложных символов без закрытых зон прилипание также вероятно. Такие буквы, как Е, К, Л, М, и цифры 2, 3 и 5 имеют частично закрытые зоны. Чтобы избежать прилипания в данных случаях, применяется метод «сглаживания». Начиная с края открытой части, символ сглаживается по направлению к закрытой части таблетки, при этом глубина гравировки постепенно снижается. Как правило, глубина «сглаженных» частей таблетки снижается на 10–50%, а чаще всего – на 30%. «Сглаживание» таблетки со снижением глубины гравировки на 50% представлено в правом нижнем углу на рисунке 5.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ПРЕСС-ИНСТРУМЕНТА

Если склеивание и залипание выявляются на этапе исследований и разработок, или появилась необходимость в заказе нового набора пуансонов в связи с имеющимися проблемами со склеиванием и залипанием, необходимо подбирать пресс-инструмент, изготовленный из специальной стали. Общеизвестно, что сталь с высокой концентрацией хрома в сплаве (как правило, 16–18%) снижает прилипание и тем самым увеличивает выход спрессованного продукта. Надежный поставщик оснастки для пресс-инструмента рабо-

тает с различными марками стали для производства пуансонов в зависимости от потребностей заказчика. Существует также несколько специальных видов стали, которые способны повысить производительность и срок службы пуансонов и штампов путем повышения их прочности, износоустойчивости и коррозионной устойчивости.

В качестве альтернативы использования специальной стали некоторые производители покрывают пуансоны из обычной стали специальными покрытиями, которые повышают их эффективность и увеличивают производительность пресс-инструмента. Наиболее распространенными типами покрытий являются хром (Cr) и нитрид хрома (CrN). При необходимости можно подобрать другие покрытия в зависимости от состава прессуемой смеси. Однако следует иметь ввиду, что со временем тонкий слой хромового покрытия стирается под воздействием прессуемого материала и применения полирующих паст. Стоить отметить, что эксплуатационные характеристики пуансонов, полностью изготовленных из стали определенной марки, выше, чем в случае использования пуансонов с покрытием.

Прежде чем выбирать оснастку для пресс-инстумента, необходимо обсудить все возможные проблемы с производителем, чтобы избежать дополнительных производственных затрат в последующем. Поставщик оснастки должен рассказать обо всех преимуществах и недостатках того или иного покрытия и материалов, которые можно применять в Вашем случае.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует несколько способов ускорить выпуск нового лекарственного препарата на рынок, начиная от незначительных изменений состава и заканчивая полной сменой дизайна таблетки и оснастки пресс-инструмента. При разработке стратегии выхода продукта на рынок необходимо сначала проконсультироваться с поставщиком пресс-инструмента. Это позволит получить конечный продукт, максимально приемлемый как для производителя, так и для потребителя. Обсуждение физических свойств прессумого материала с поставщиком пресс-инструмента на этапе разработкии дизайна таблетки позволит избежать проблем со склеиванием и залипанием в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Sedlock. European Pharmaceutical Manufacturer, 2016:16(2);16-17.
2. S. Paul et al. J. Pharm. Sci., 2017. № 106(1). P. 151–158.



ИЗМЕРЕНИЕ НЕСФЕРИЧЕСКИХ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА (PIDS™)

Материал предоставлен компанией Beckman Coulter

ВВЕДЕНИЕ

Почти все анализаторы частиц, основанные на применении лазера, не учитывают форму исследуемого материала независимо от размера частиц. Причина этого заключается в тех методиках, которые применяются для определения распределения частиц по размерам с использованием данных, полученных в ходе анализов.

Математические модели, используемые для определения распределения частиц по размерам, основаны на сферической системе. Именно поэтому любое распределение является эквивалентным сферическому распределению анализируемого материала. В большинстве случаев такой подход считается приемлемым, поскольку большинство частиц имеют сферическое распределение.

В лазерных анализаторах частиц серии LS™ от Beckman Coulter применяется уникальная технология дифференциального рассеяния поляризованного света для измерения субмикронных частиц. В данной статье рассматривается процесс измерения несферических частиц с помощью PIDS-систем.

ПОЧЕМУ PIDS?

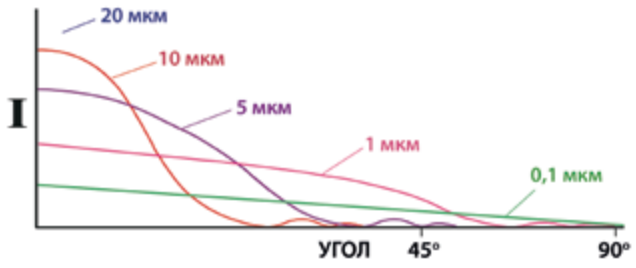
В чем же заключается преимущество использования метода PIDS вместо стандартной технологии определения светорассеяния?

Рассеяние лазерного света крупными частицами происходит исключительно под малыми углами с легко различимыми максимумами и минимумами на диаграмме рассеяния. Это говорит о том, что детекторы, расположенные под малыми углами по отношению к световому пути и имеющие достаточное угловое разрешение, могут определять максимальные и минимальные значения (рисунок 2).



Рисунок 1. Анализатор частиц Beckman Coulter LS 13 320 с жидкостным модулем (ALM) и системой автоматической загрузки

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Риунок. 2. Слабый сигнал рассеяния от малых частиц (размер менее 1 мкм) затрудняет измерение максимальных и минимальных значений под большими углами

Малые частицы, наоборот, рассеивают свет крайне плохо, и определение минимумов и максимумов возможно лишь под большими углами. Это затрудняет определение и построение диаграммы рассеяния.

Некоторым производителям удалось решить данную проблему. Большинство усилий было направлено на измерение светового излучения обратного рассеяния. Хотя подобные подходы и работают, они не решают проблему полностью и должны рассматриваться лишь как временная мера.

Компания Beckman Coulter разработала технологию PIDS для измерения субмикронных частиц с высоким разрешением, которая позволила в полной мере решить проблему измерения частиц субмикронных размеров.

PIDS

Технология PIDS™ (дифференциальной интенсивности поляризованного света) основана на использовании классической теории светорассеяния Ми.

Механизм PIDS основан на явлении поперечности световых волн, а векторы напряженности магнитного и электрического полей расположены под углом 90°. Например, при вертикальном расположении вектора напряженности электрического поля свет считается вертикально поляризованным.

При облучении образца световым потоком определенной поляризации переменное электрическое поле создает диполь, или колебание электронов в образце. Эти колебания будут находиться в той же плоскости поляризации, что и источник света. Колеблющиеся диполи в частицах излучают свет во всех направлениях, кроме направления самого источника света.

Механизм действия PIDS основан именно на этом явлении. Образец последовательно облучают светом с различной длиной волны (450 нм, 600 нм и 900 нм), сначала вертикальной, а затем горизонтальной поляризации. Измерение рассеянного или излучаемого света происходит под различными углами. Далее, анализируя разницу между вертикально и горизонтально рассеянным светом для каждой длины волны, можно получить информацию о распределении частиц образца по размеру. Важно помнить, что мы измеряем разницу между горизонтально и вертикально поляризованными сигналами, а не просто измеряем значения при определенной поляризации.

Информация об интенсивности при определенных углах рассеяния, полученная с помощью PIDS, затем используется в стандартных алгоритмах расчета распределения частиц по размерам, применяемым в случае лазерного светорассеяния. При использовании моделей LS 13 230 и LS 13 320 распределение частиц по размерам составляет от 0,04 мкм до 2000 мкм.

Одним из основных преимуществ применения PIDS является возможность определения присутствия малых частиц в образце путем простой обработки исходных данных.

Таблица 1.

Средние размеры частиц

Стандартный (номинальный) размер	Оценочные данные	Значения, полученные с помощью анализатора серии LS
100 нм	102±3 нм	108 нм
150 нм	155±4 нм	151 нм
220 нм	220± 6 нм	211 нм
300 нм	300±5 нм	306 нм
404 нм	404±6 нм	400 нм

ИЗМЕРЕНИЕ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ

В данном разделе будет рассмотрена эффективность применения PIDS для измерения сферических частиц. Наиболее надежным способом в данном случае является измерение частиц, свойства которых хорошо известны. Оптические свойства полистироловых сфер тщательно изучены, а сам материал является приемлемым для подобного рода исследований.

На рисунке 3 и в таблице 1 показаны результаты, полученные с помощью анализаторов серии LS для исследуемых стандартов.

В данном примере наглядно продемонстрирована пригодность PIDS для точного измерения размера сферических частиц. На следующем этапе данного

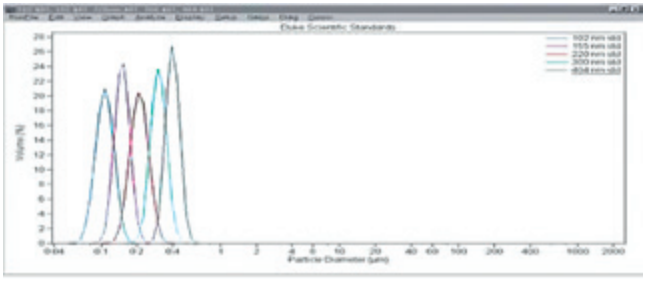


Рисунок 3. Наложенное распределение значений пяти тестируемых образцов из полистирола, полученных с помощью анализаторов серии LS™ [Источник: Duke Scientific, Inc.]

исследования мы попробуем оценить эффективность применения PIDS для измерения несферических частиц.

ИЗМЕРЕНИЕ НЕСФЕРИЧЕСКИХ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ

До недавнего времени было крайне трудно подобрать подходящие субмикронные, несферические частицы для исследований подобного рода ввиду отсутствия независимых данных об исследовании данных материалов. На сегодняшний день ситуация стабилизировалась. На рисунке 4 показаны результаты, полученные путем анализа субмикронных частиц гематитовых стержней (сжатых эллипсоидов).

Размер частиц (определенный с помощью сканирующей электронной микроскопии или СЭМ) составляет 46,9 нм в ширину и 130,8 нм в длину (приблизительное соотношение сторон – 3:1). Эти частицы однородны и легко рассеиваются.

Определение распределения частиц гематитовых стержней по размеру с помощью анализаторов серии LS

Оптические свойства гематитовых стержней были определены для мнимой части коэффициента преломления с помощью UV/Vis-спектроскопии и для действительной части – с помощью UV/Vis-спектроскопической эллипсометрии.

Среднее значение размеров частиц, полученных с помощью анализатора серии LS, равно 78 нм (рисунок 5), что идеально соответствует ожидаемому результату, учитывая хаотичное движение частиц в измеряемом образце. Согласно статистике, указанный средний размер должен являться функцией всех возможных направлений движения частиц по мере их прохождения по световому пути. Кроме того, большинство приборов разработано с учетом произвольной ориентации частиц в образце в зависимости от их морфологии или формы.

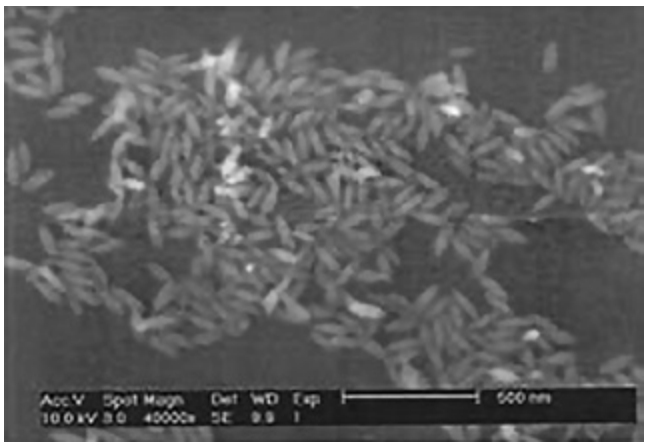


Рисунок 4. Микрофотографический снимок образца гематитового стержня

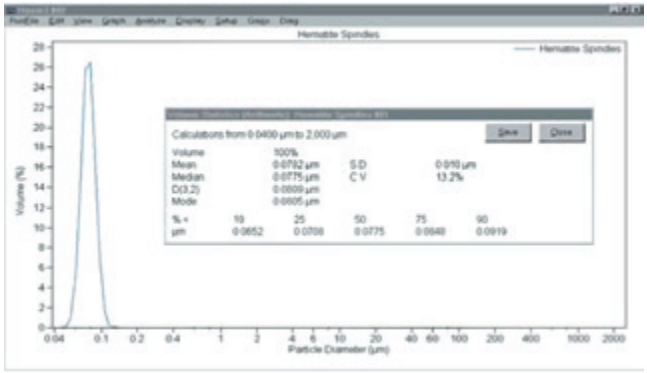


Рисунок 5. Среднее значение 78 нм, полученное с помощью анализатора серии LS™, является приемлемым, учитывая хаотичное движение частиц в измерительной ячейке

АНАЛИЗ НЕОБРАБОТАННЫХ ДАННЫХ PIDS

Как упоминалось ранее, PIDS™ имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что необработанные данные могут указать на присутствие малых частиц в образце. Эта уникальная особенность технологии PIDS позволяет избежать работы «вслепую» в том случае, когда присутствие малых частиц в образце неочевидно и может являться искажением. К большому сожалению, данная проблема присуща многим лазерным анализаторам частиц.

Наличие крупных частиц не создает помех для PIDS-сигналов и не приводит к искажению результатов ввиду того, что светорассеяние от больших частиц не является дифференцированным по своей природе. Проще говоря, крупные частицы рассеивают фактичес-

ки равное количество света как вертикальной, так и горизонтальной поляризации для каждой длины волны. PIDS-система выявляет разницу между сигналами поляризационного рассеяния (что актуально только для частиц малого размера).

ВЫЯВЛЕНИЕ МАЛЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА НЕОБРАБОТАННЫХ ДАННЫХ

Было выполнено сравнение двух образцов (рисунок 6) путем анализа необработанных данных PIDS; средний размер первого образца – 102 нм, а второго – 13 мкм. Для каждого образца проводилось в общей сложности 42 дискретных измерения, выполняемых с использованием 6 детекторов и концентрационного детектора.

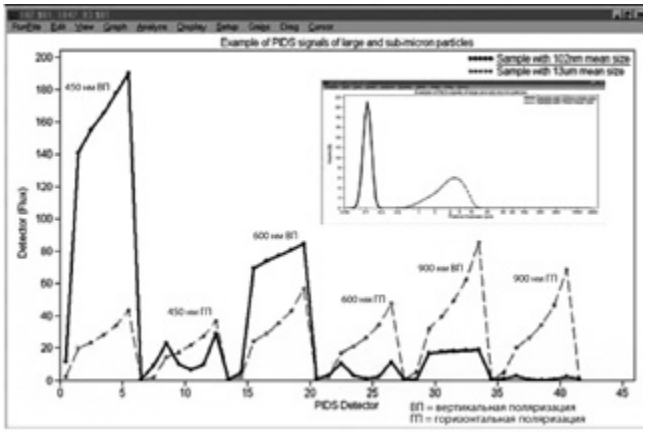


Рисунок 6. Необработанные данные PIDS, полученные путем стандартного анализа малых и крупных частиц

При проведении анализа частиц субмикронного размера необходимо учитывать следующее.

- Определенная с помощью PIDS интенсивность сильно различается в зависимости от поляризации при той же длине волны.
- Интенсивность горизонтального светорассеяния для каждой длины волны сильно зависит от угла детектирования.
- Наличие легко детектируемого сигнала светорассеяния (Detector Flux, ось Y).

При проведении анализа частиц крупного размера необходимо учитывать следующее.

- Определенная с помощью PIDS интенсивность одинакова для каждого вида поляризации при каждой длине волны.
- Существует простая линейная связь между двумя видами поляризации для каждой длины волны с точки зрения интенсивности углового рассеяния.
- Наличие слабого сигнала светорассеяния (Detector Flux, ось Y).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье было доказано, что технология PIDS является точной и практичной методикой для измерения сферических, субмикронных частиц. В случае измерения несферических субмикронных частиц эта технология также позволяет получить значимые данные, несмотря на существующие ограничения применения техники светорассеяния.

BECKMAN COULTER
Life Sciences

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКА ИЗ ТКАНЕЙ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Материал предоставлен компанией Hielscher

ВВЕДЕНИЕ

Экстракция белка из тканей и клеточных культур – это начальный этап подготовки образца, используемый при проведении множества различных биохимических и аналитических исследований, таких как иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), параметрический анализ насыщения генов (PAGE), вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия и очистка белка. Ультразвуковое расщепление, лизис и экстракция белка представляют собой точную, хорошо контролируемую методику, которая обеспечивает высокий выход белка.

ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКА ИЗ ТКАНИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Для подготовки полноразмерного образца ткани (например, почек, сердца, легких, мышечной ткани и т.д.) необходимо нарезать его на очень мелкие кусочки при помощи стерильного инструмента (по возможности положив на лед). Делать это необходимо как можно быстрее, чтобы не допустить разрушения белков протеазами (например, лизирующие буферы, такие как буфер для радиоиммунопреципитационного анализа или гипотонический лизирующий буфер содержат смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз). После измельчения образец ткани помещается в жидкий азот для мгновенного замораживания. Образец можно хранить при температуре –80 °C с целью последующего использования. Для экстренной гомогенизации достаточно выложить ткань на лед. Непосредственно перед ультразвуковой обработкой лизирующий буфер, охлажденный до температуры 0°C (с ингибиторами протеазы ДТТ, леупептином и апротинином), быстро добавляется в пробоотборную трубку (на 10 мг исследуемого образца должно приходиться примерно 600 мкл буфера). Рекомендуемое количество ткани, которое может находиться в пробоотборной трубке, составляет 20–60 мг.

Ультразвуковая гомогенизация, лизис и экстракция белка осуществляются при помощи ультразвукового гомогенизатора, оснащенного сонотродом с микронаконечником, например UP200Ht или UP200St. Продолжительность обработки ультразвуком составляет 60–90 с в режиме чередования 15-секундного воздействия ультразвука с 10-секундными перерывами. Образец ткани должен все время находиться на льду.

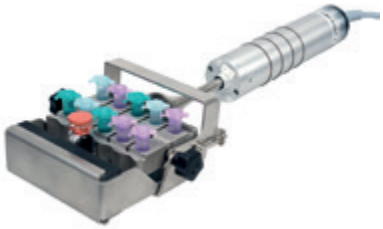
После ультразвуковой гомогенизации/эстракции лизат очищается в центрифуге при 27 000 g в течение примерно 20 мин. После этого производится сбор супернатанта и определение концентрации белка с помощью метода количественного анализа Пирса с BCA-реагентом.

ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Для получения гомогенной смеси из сыворотки крови и фосфатного буфера исследуемый образец сначала перемешивается и только потом подвергается ультразвуковому клеточному лизису. В процессе лизиса клетки образца разрушаются под действием ультразвука в ультразвуковом лабораторном гомогенизаторе, таком как UP100H, в течение 8 циклов с 20% амплитудой. В каждом цикле аппарат включается на 5 с, после чего выключается на 15 с. Ультразвуковая обработка производится путем циклического диспергирования исследуемого об-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

разца с помощью ультразвука. При этом смесь помещается на лед, который защищает ее от перегрева и термического разложения. Поскольку сыворотка крови содержит большое количество высокомолекулярных белков (альбумин, α1-антитрипсин, трансферрин, гаптоглобулин, иммуноглобулин G и иммуноглобулин A), которые мешают определению низкомолекулярных белков методом изоэлектрического фокусирования, рекомендуется удалять их из сыворотки с использованием специальной очистительной колонки.



Преимущества VialTweeter заключаются в высокой скорости работы и производительности, эффективности, точной настройке параметров, воспроизводимости результатов и возможности линейного масштабирования.

ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТА INOS С ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Для получения фермента iNOS с повышенной активностью (например, с целью обнаружения наркотиков) рекомендуется придерживаться следующего протокола анализа: суспензию клеток необходимо поместить на лед и воздействовать на них ультразвуком с применением гомогенизатора UP100H с амплитудой 10 мкм по следующей схеме: 5 с – ультразвуковая обработка и 25 с – перерыв. Процедуру повторяют 3 раза. Перерывы между периодами ультразвуковой обработки способствуют понижению температуры, что, в свою очередь, снижает риск денатурации.



УЛЬТРАЗВУКОВОЕ РАСТВОРЕНИЕ БЕЛКА

Воздействие ультразвуком может ускорить процесс растворения белка, который обычно длится несколько часов. Чтобы не перегреть исследуемый образец ткани и предотвратить разрушение и модификацию белка в растворах, содержащих мочевину, ультразвуковые импульсы должны длиться не более нескольких секунд.

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

Температурный режим. Для обеспечения высокого выхода белка без термической денатурации важно строго соблюдать температурный режим. Современные ультразвуковые гомогенизаторы марки Hielscher, известные также как ультразвуковые дезинтеграторы, позволяют точно контролировать температуру. Они оснащаются встроенным температурным датчиком. В настройках ультразвукового гомогенизатора можно задать температурный максимум. При достижении этого значения прибор автоматически отключается до тех пор, пока образец ткани не охладится.

Буфер. Выбор наиболее подходящего буфера, а также его оптимального объема зависит от типа исследуемой ткани. Оба эти параметра выявляются экспериментальным методом.

Выделение/очистка. Белковые лизаты могут содержать избыточное количество биомолекул, таких как ДНК или углеводы, которые можно отделить методом осаждения белка (дезоксихолатной трихлоруксусной кислотой) или путем замены буфера.

По данным Chittapalo and Noomhorm, выход белка стал выше под воздействием ультразвука, а процессы ультразвуковой гомогенизации и лизиса значительно активизируют текущие процессы экстракции, открывая новые коммерческие возможности выделения белка.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ БЕЛКА

Компания Hielscher Ultrasonics предлагает широкий выбор ультразвуковых гомогенизаторов для расщепления клеток, тканей, бактерий, микроорганизмов, дрожжевых грибков и спор.

Лабораторные ультразвуковые гомогенизаторы Hielscher – это мощные, но простые в управлении аппараты, созданные для функционирования в режиме 24/7, они представляют собой высокопрочные и функциональные устройства для настольного и напольного использования в лабораторных условиях. Для всех аппаратов этого бренда предусматривается возможность точной регулировки выходной мощности и амплитуды. Большой ассортимент дополнительных комплектующих и аксессуаров позволяют легко повысить функциональность приборов. Цифровые устройства, такие как VialTweeter, UP200Ht, UP200St и UP400St, оснащаются интегрированным датчиком температуры и встроенной SD-картой для автоматической записи данных.

VialTweeter со специальными насадками может применяться для непрямой одновременной обработки нескольких образцов без риска перекрестной контаминации.

BINDER
Best conditions for your success

6 ФАКТОРОВ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ПОКУПКЕ КЛИМАТИЧЕСКОЙ КАМЕРЫ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ИНДУСТРИИ

Материал предоставлен компанией BINDER

ВВЕДЕНИЕ

Бесперебойная долговременная работа климатической камеры служит важной предпосылкой для успешных испытаний стабильности фармпрепаратов, проводимых в соответствии с руководящими принципами Международной конференции по гармонизации (ICH), а также для испытаний по определению срока хранения, который может составлять от нескольких месяцев до нескольких лет.

Какие технические решения доступны в настоящее время для обеспечения надежной непрерывной работы камеры? На какие факторы следует обращать особое внимание и какие преимущества и недостатки имеют устройства такого типа?

В этой статье мы постарались представить ответы по 6 ключевым темам.

1. Условия окружающей среды.

Наряду с задачей создания определенных условий окружающей среды важную роль играют такие характеристики как флуктуация и однородность (отклонения значений по времени и объему). Здесь приоритетное значение имеет система подачи воздуха в климатической камере. Очень полезно сравнить различные климатические диаграммы, особенно при проведении стресс-тестов.



2. Подача воздуха.

Система подачи воздуха в климатической камере отвечает за хорошее распределение температуры и влажности, когда камера находится в нагруженном состоянии. Представлены две схемы подачи воздуха.

3. Вода для увлажнения.

Дается сравнение двух типов подвода и отвода воды, а также двух типов увлажнения. Система очистки воды также важна, если качество водопроводной воды недостаточное и требуется ее очистка. Показан способ оптимального решения данного вопроса.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

4. Освещение.

Для испытаний фотостабильности, проводимых в соответствии с директивой ICH Q1B, решающее значение имеют источники света, уровни освещенности и типы датчиков в зависимости от возможности фиксации световых лучей различного направления.

5. Работа в непрерывном режиме.

Прочная конструкция, использование надежных компонентов, долговечность материалов и высококачественная технология измерения и управления – все это решающие моменты для обеспечения точности и стабильности климатических параметров.

6. Программирование и документация.

Возможность программирования опций в режиме реального времени упрощает работу оператора. Функции регистрации показаний, контроль и мониторинг параметров климатической камеры имеют основополагающее значение для подачи заявки на получение требуемых разрешающих документов со стороны соответствующих надзорных органов.

1. УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В камере создаются и поддерживаются климатические условия с контролируемой относительной влажностью и температурой, например 40 °C и относительной влажности 75%. По графику температуры и влажности можно быстро узнать информацию обо всем диапазоне рабочих характеристик климатической камеры.

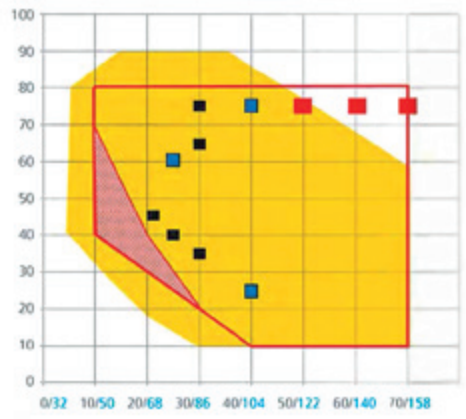


Рисунок 1. Сравнение с функциональными возможностями камеры другого производителя.

Желтая зона условий окружающей среды не охватывает стресс-тесты в соответствии с требованиями ICH Q1A

Однако решающее значение имеет не только размер климатической зоны, но и определенные отклонения значений по объему и времени.

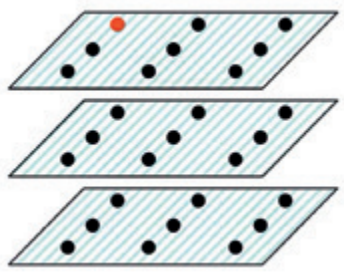


Рисунок 2. Флуктуация: отклонение по температуре и влажности – это разница значений, зафиксированных в одной точке в разное время, например ±0,1 K при 40 °C и относительной влажности 75%

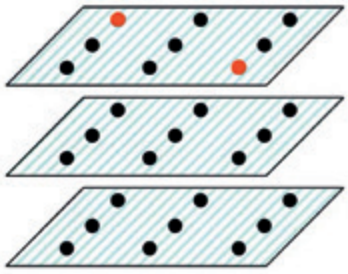


Рисунок 3. Одронодность: отклонение в объеме, по температуре и влажности – это разница величин, измеренных в одно и то же время в двух точках, например ±0,2 K при 40 °C и относительной влажности 75%

Для регистрации данных отклонений должно применяться 27-точечное измерение, требования к отклонениям определены стандартом DIN 12 880:2007.

В сертификатах калибровки, предоставляемых производителем для значений температуры и влажности, задокументировано отклонение по объему.

Фактическое значение климатических параметров внутри камеры сильно зависит, в том числе, от условий окружающей среды в помещении, где она установлена. Это необходимо учитывать при выборе камеры для долгосрочных испытаний стабильности препаратов, особенно при высоких значениях температуры и влажности.

Следует отметить, что спецификации, касающиеся температуры и влажности, которые дает производитель, относятся к условиям пустого помещения или незагруженной камеры. По этой причине при загруженной камере особое значение имеет тип подачи воздуха.

2. ПОДАЧА ВОЗДУХА

Движение воздуха в климатической камере имеет решающее значение для высокоточной температуры и влажности, которые создаются на всех полках, находящихся в нагруженном состоянии.

Различают горизонтальный и вертикальный тип подачи воздуха.

- **Горизонтальное движение воздуха.** В этом случае поток воздуха с контролируемой температурой и влажностью проходит с боковых сторон по всей ширине каждой полки (в направлении справа налево или наоборот). При загрузке готовыми лекарственными препаратами для каждой стойки создаются одинаково хорошие условия. Двустороннее горизонтальное движение воздуха с обеих сторон полок представляет собой идеальное решение (рисунок 4). Такое решение также обеспечивает более низкую скорость движения воздуха в камере. Это является безусловным преимуществом при тестировании АФИ или готовых лекарственных средств.
- **Вертикальное движение воздуха.** В этом случае поток воздуха с контролируемой температурой и влажностью направляется снизу вверх через каждую отдельную полку. В нагруженном состоянии верхние полки загораживаются нижними полками. Равномерное движение воздуха по всем полкам становится невозможным. В результате возникают ограничения, затрагивающие структуру готовых лекарственных препаратов (FPP).



Рисунок 4. Двустороннее горизонтальное движение воздуха создает особо однородные условия. Воздух возвращается к задней стенке и проходит через вентилятор для рециркуляции

3. ВОДА ДЛЯ УВЛАЖНЕНИЯ

При использовании климатических камер необходимо учитывать тип подвода и отвода воды, метод увлажнения и качество воды.

Чтобы подключиться к системе водоснабжения и канализации на месте установки камеры, необходимы следующие условия: давление в системе снабжения от 1 до 10 бар и температура воды не ниже +5 °C и не выше +40 °C.

Вода подается автоматически. В комплект к некоторым климатическим камерам входит набор для подключения.

Вторая альтернатива – использование канистр большого объема для подачи свежей воды и сбора конденсата; канистры устанавливаются непосредственно на климатической камере. Затем камеру устанавливают независимо от места нахождения стационарной системы водоснабжения и канализации. Если канистра для свежей воды пуста, на дисплее должно появиться предупреждающее сообщение. Расход воды в существенной мере зависит от заданного значения влажности и частоты открывания двери. Конденсат не рекомендуется использовать повторно для увлажнения, так как это может привести к концентрации нежелательных веществ.

Паровые и ультразвуковые системы увлажнения являются наиболее распространенными типами увлажнителей. Хороший паровой увлажнитель поддерживает воду точно в точке кипения, поэтому при необходимости увлажнение можно обеспечить моментально. Вода, используемая для увлажнения, постоянно стерилизуется при температуре 100 °C, при этом риск биологического загрязнения снижается до минимума. Конденсат собирается перед тем, как достичь зоны испытания, и, таким образом она гарантированно остается свободной от конденсата. Ультразвуковые увлажнители генерируют сверхтонкие капли (без образования аэрозоля), которые направляются в испытательную камеру и испаряются в ней. Чтобы избежать понижения температуры в испытательной камере (адиабатическое охлаждение), необходимо произвести повторный нагрев. Избыток воды, используемой для увлажнения, собирается в каплесборники.

Осушение осуществляется путем снижения температуры теплообменника ниже точки росы. Высокоточные измерения и контроль обеспечивают поддержку стабильных параметров температуры и влажности.

Необходимо подчеркнуть тот факт, что качество воды имеет огромное значение. Должна использоваться полностью обессоленная вода с уровнем электропроводности в пределах от 1 мкСм/см до 20 мкСм/см максимум. Если качество воды не соответствует требованиям, ее необходимо подвергнуть обработке. Для этой цели подходят ионообменные системы со сменными фильтровальными патронами.

Чтобы снизить риск биологического загрязнения, многие производители также предлагают для ультразвукового увлажнителя систему очистки воды с УФ-С.



Рисунок 5. **Срок службы аппарата зависит от качества и расхода воды**

4. ОСВЕЩЕНИЕ

Для испытаний фотостабильности, которые должны проводиться в соответствии с рекомендацией ICH Q1B, имеются точные указания в отношении источников света и показателей уровней освещенности. Позиция видимого света [VIS, соответствует стандарту ISO 10977 (1993)] должна составлять не менее 1,2 млн люкс-часов, а ближнего ультрафиолета (длина волны от 320 нм до 400 нм) – не менее 200 Вт-ч/м^2.



Рисунок 6. **Источники света, размещенные над каждой полкой, равномерно освещают всю площадь полки. Благодаря геометрии рассеивателя достигается совершенно однородное распределение светового облучения**

Важно определить расстояние, на котором достигаются указанные изготовителем параметры светового облучения, например VIS 8750 лк или УФ-А 1,1 Вт/м^2. Чем больше расстояние до источника света, тем ниже интенсивность излучения и тем больше продолжительность облучения. Актинометрические системы описаны в директиве ICH Q1B.

Фотохимический эффект определяется жидкостью в стеклянной колбе независимо от направления.

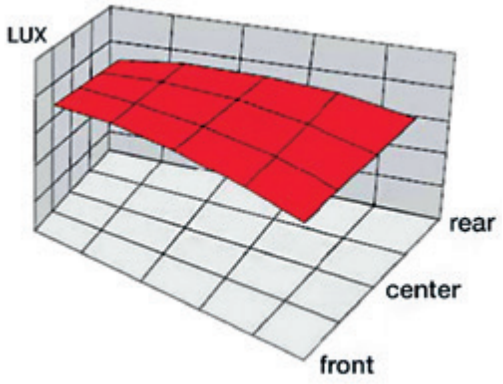


Рисунок 7. **Интенсивность освещения над полкой с рассеивателем**

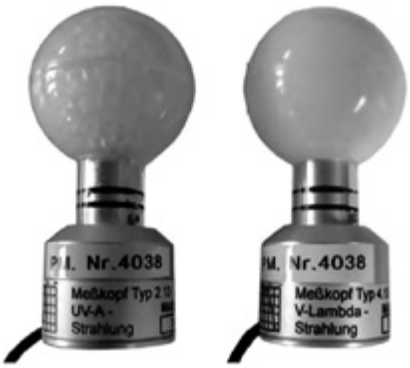


Рисунок 8. **Плоский датчик считает количество света, падающего на образец под углом меньше, чем при вертикальном облучении. Это приводит к недооценке энергии излучения, что, в свою очередь, приводит к избыточному времени облучения и, возможно, ложноположительным фотохимическим эффектам**

Что касается точности измерений, сферические датчики наиболее близки к актинометрическим системам, то есть лучи, падающие под углом, оцениваются в той же степени, что и количество света, падающего под вертикальным углом. Поэтому они особенно хорошо подходят для распределенных в пространстве объектов, например таких, как упаковка. Сферические датчики измеряют фактическое количество света, в то время как планарные датчики определяют количество падающего света на поверхность плоского датчика.

5. РАБОТА В НЕПРЕРЫВНОМ РЕЖИМЕ

В директиве ICH Q1A содержатся требования по длительности испытаний, которые составляют не менее 6–12 мес, в зависимости от условий испытаний, в отдельных случаях могут достигать 36 мес.

Ниже представлены 4 примера того, как можно увеличить срок службы климатических камер.

1. При проведении долгосрочных испытаний, требующих создания особых климатических условий, как можно больше компонентов камеры должно быть изготовлено из коррозионно-стойкой нержавеющей стали, например марки 1.4201 или 1.4501. Это относится не только к испытательному отсеку и стойкам, на которые укладываются фармпрепараты, но и к теплообменнику. Идеально, если места соединения с контуром охлаждения будут также изготовлены из нержавеющей стали, чтобы исключить электрохимическую коррозию.
2. Признак максимальной надежности – это камера с дверкой, имеющей тройное уплотнение. Это до минимума снижает нежелательное воздействие на климат, поддерживаемый в тестовом отсеке, и служит гарантией успешного завершения длительного испытания.
3. Использование паровых увлажнителей с увеличенным сроком службы подтверждает чрезвычайно низкий уровень отказов – менее 1% в течение первых пяти лет непрерывной работы.
4. Максимальная общая нагрузка на климатическую камеру с четырьмя полками может быть увеличена до 280 кг, то есть на каждую стойку может приходиться по 70 кг.

6. ПРОГРАММИРОВАНИЕ И ДОКУМЕНТАЦИЯ

Программирование в режиме реального времени делает работу намного проще по сравнению с утомительным ручным программированием.

Пример

С полуночи среды 1 марта до полуночи четверга 31 августа вы хотите провести испытания долгосрочной стабильности при 40 °C и относительной влажности 75%. Для программирования в режиме реального времени просто введите дату и время начала и окончания испытания. Готово.

В случае ручного программирования записи выполняются математически, без ссылки на дату и время. Сначала необходимо рассчитать количество часов, отводимых для теста, и добавить это количество к значению tStart (1 марта, полночь). Для нашего примера количество будет равно 184 дням, или 4416 часам. Исходя из этого, можно вычислить tEnd (31 августа). Данный вид программирования является более трудоемким и допускает вероятность наличия ошибок в расчетах.

Производитель должен всегда предлагать вам несколько опций, предназначенных для регистрации, контроля и мониторинга параметров климатической камеры.

Оценивайте возможности климатической камеры на основе этих критериев и вы подберете модель, подходящую для ваших условий применения!



BINDER
Best conditions for your success

АВТОМАТИЗАЦИЯ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» И ВИДЫ ТЕСТЕРОВ РАСТВОРЕНИЯ

АВТОР

А.А. Сапронов,
продакт-менеджер
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Автоматизация применительно к тесту «Растворение» может восприниматься по-разному. Полная автоматизация подразумевает под собой несколько вещей: полностью автономная (без вмешательства оператора) подготовка среды растворения, проведение теста «Растворение» и автоматизированная очистка системы перед началом следующего теста. При этом методы могут быть абсолютно разными или это может быть один и тот же метод, который повторяется раз за разом.

РУЧНОЙ ТЕСТЕР ИЛИ ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА?

Когда отбор проб при растворении осуществляется вручную, то каждая стадия процесса до, во время и после теста выполняется химиком-аналитиком, который заполняет каждый сосуд подготовленной средой и периодически измеряет их объем с помощью мерного цилиндра. Ввод образца также проводится вручную, а значит, существует риск, что таблетки даже из одной партии опустятся на дно стакана растворения в различных направлениях. Если во время теста имеет место замена среды растворения, то это может быть наиболее субъективным моментом в тестировании. Изменение pH среды также очень важно для лекарственных форм с пролонгированным и модифицированным высвобождением. Процесс ручного изменения pH приводит к тому, что результаты теста становятся зависимыми от того, как именно и как быстро была произведена замена среды. В ходе отбора проб существует риск получить необъективные результаты, поскольку аналитик может взять пробу некорректно: расположить канюли на разной высоте и с разной ориентацией в сосуде. Аналогичная ситуация может сложиться и на завершающем этапе – этапе очистки: она может быть проведена неравномерно и не будет полной. Таким образом, при ручном проведении теста «Растворение» существует риск увеличения затрат при снижении эффективности. Полностью автоматизированные системы растворения позволяют проводить тест «Растворение» автоматически и идентич-



Ручной тестер растворения Sotax AT

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

но, получать точные данные, исключая возможность ошибки со стороны лаборанта за счет его минимального участия в процессе, что в конечном итоге оправдывает инвестиции. Действия лаборанта ограничиваются лишь подготовкой тестера, настройкой самого теста и программированием метода. Все остальные этапы проведения теста «Растворение» (ввод и отбор проб, фильтрация, количественное определение и формирование отчета, а также очистка) выполняются автоматически. Более того, все этапы теста или серии тестов могут проводиться в непрерывном режиме в течение всего дня, ночи и даже в выходные дни, что существенно сокращает время простоя, увеличивает производительность и освобождает дополнительное время для исследовательской деятельности операторов.

Ключевой задачей, которую можно решить с помощью полностью автоматизированной системы растворения, является повышение эффективности работы лаборатории. Решение указанной задачи достигается за счет оптимизации управления и очистки тестера: быстрая подготовка к тесту, наполнение и слив среды, водяная баня со встроенным быстродействующим термостатом, автоматизированная функция отбора образцов и автоматическая очистка после завершения теста, – все это позволяет проводить тест «Растворение» без контроля со стороны оператора. Более того, автономное проведение теста «Растворение» позволяет лаборантам освободить время для выполнения более важных задач: разработки метода, валидации процесса, проверки данных и верификации. Сокращение времени цикла испытаний с помощью внедрения автоматизации в лабораториях позволяет многим компаниям оставаться конкурентоспособными. Размещая автоматизированные системы в научно-исследовательских подразделениях или в отделах контроля качества, компании могут легко осуществить трансфер методов, что позволяет сократить время вывода на рынок новых продуктов. Недочеты в лабораторных исследованиях – одно из ключевых нареканий со стороны надзорных органов в фармацевтической промышленности. Полностью автоматизированные тестеры растворения, снижая вероятность человеческих ошибок и упрощая процесс исследования, существенно повышают качество данных исследования. Каждый тест «Растворение» выполняется таким же образом и по той же схеме, что и предыдущие серии тестов, тем самым обеспечивая получение более точных данных. Каждый шаг записывается в защищенной базе данных, сводя к минимуму возможности ошибочного ввода данных и исключая зависимость полученных результатов тестов от операторов. Безопасность обеспечивается за счет снижения воздействия опасных веществ, используемых во время тестирования. К тому же автоматизация уменьшает эргономическое напряжение, устраняя выполнение рутинных задач: отбор проб и фильтрации.



Ручной тестер растворения Sotax AT7smart

ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ИЛИ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ ТЕСТЕР РАСТВОРЕНИЯ?

Наличие коллектора фракций и автоматический отбор проб крайне удобны и позволяют осуществлять отбор проб из стаканов в запрограммированные временные интервалы. Это особенно полезно при исследованиях с несколькими временными точками отбора проб. Кропотливые задачи по дегазации, наполнению и очистке сосудов также могут осуществляться в автоматическом или полуавтоматическим режимах, что позволяет обеспечить повторение метода. С точки зрения окупаемости инвестиций выбор полуавтоматизированных тестеров не имеет серьезных отличий, как если бы аналитик продолжал проводить тест «Растворение» вручную. Время проведения теста в этом случае одинаково. В случае полной автоматизации теста «Растворение» лаборанту не потребуется участвовать в процессе. Следовательно, при полной автоматизации процесса при задании временного интервала тестирования и программировании метода, по которому система его будет проводить, оператору



Полуавтоматическая система растворения Sotax AT offline



Полуавтоматическая система растворения Sotax AT on-/offline

не придется выполнять дополнительные манипуляции для перехода к следующему тесту после завершения предыдущего.

РУЧНОЕ ИЛИ АВТОМАТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПАРТИИ?

Аргумент в пользу использования полностью автоматизированной системы базируется на том, что при ручном/полуавтоматизированном тесте «Растворение» аналитик тратит практически все свое время на поддержание и контроль за работой системы – ему (аналитику) приходится использовать одновременно несколько водяных бань (как правило, 4-8), и практически 100% своего времени он будет тратить на проведение теста «Растворение». Как следствие, у аналитика практически не останется времени на другую работу. При использовании полностью автоматизированных систем аналитику необходимо только настроить и запрограммировать тестирование продукта, например в начале дня, а все оставшееся время он может посвятить разработке технологии производства новых продуктов. В результате существенно увеличивается эффективность и производительность труда как самого сотрудника, так и компании в целом. Окупаемость инвестиций от перераспределения труда за счет автоматизации теста «Растворение» оценивается в следующих показателях: общий временной интервал на весь цикл тестирования, пропускная способность и прерывание процесса (технические неисправности).

МНОГООБРАЗИЕ МЕТОДОВ ВО ВРЕМЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ОДНОЙ ПАРТИИ

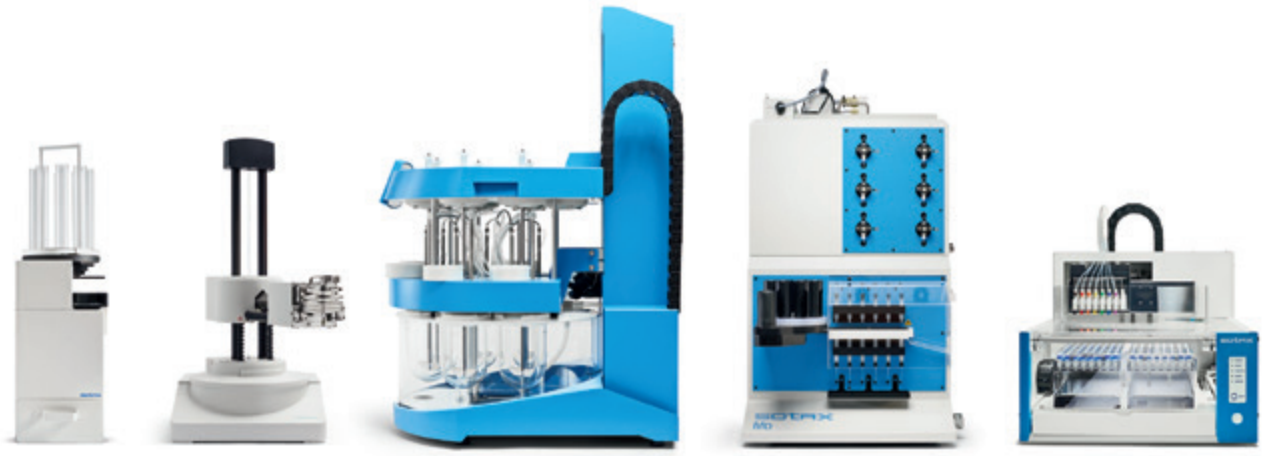
Автоматизированные тестеры позволяют проводить исследование различных типов лекарственных форм или задействовать разнообразные методы, задавать различные условия испытания одной партии продукта. Система Sotax AT MD способна в полностью автоматическом режиме провести до 8 серий анализов растворения в 6 стаканах, отобрав при этом пробы и проанализировав их на хроматографе или спект-



Полностью автоматическая система растворения Sotax AT70smart



Тестер растворения SOTAX AT MD и MD-станция



Слева направо:
станция хранения и сбора корзинок (USP); роботизированная рука; тестер растворения AT MD; MD-станция; коллектор фракций SAM

рофотометре, задокументировав все полученные результаты.

Трудоемкая задача по вводу проб и очистке стаканов тестера растворения быстро решается за счет полной автоматизации процесса: полностью автоматические системы автоматизируют весь процесс исследования растворения, начиная от подготовки среды и заканчивая очисткой и промывкой системы растворения. Несколько тестов одинаковых либо различных продуктов можно выполнить последовательно друг за другом без необходимости вмешательства оператора, который может освободившееся время потратить на разработку новых продуктов.

ТЕСТ USP 4 (АППАРАТ 3) «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА»

Отдельно необходимо отметить тестер растворения «Проточная ячейка»: ввиду универсальности конструкции тестера имеется возможность использования определенных типов ячеек под различные продукты. Можно с уверенностью сказать, что тестер «Проточная ячейка» является универсальным инструментом как для R&D-, так и QC-лабораторий. В Российской Федерации со вступлением в силу Государственной фармакопеи XIII изд. ОФС «Растворение для суппозиториев на липофильной основе» стала обязательной к исполнению для всех производителей суппозиториев. Для исполнения данной статьи производителю необходимо иметь тестер «Проточная ячейка» со специальными ячейками для растворения суппозиториев.

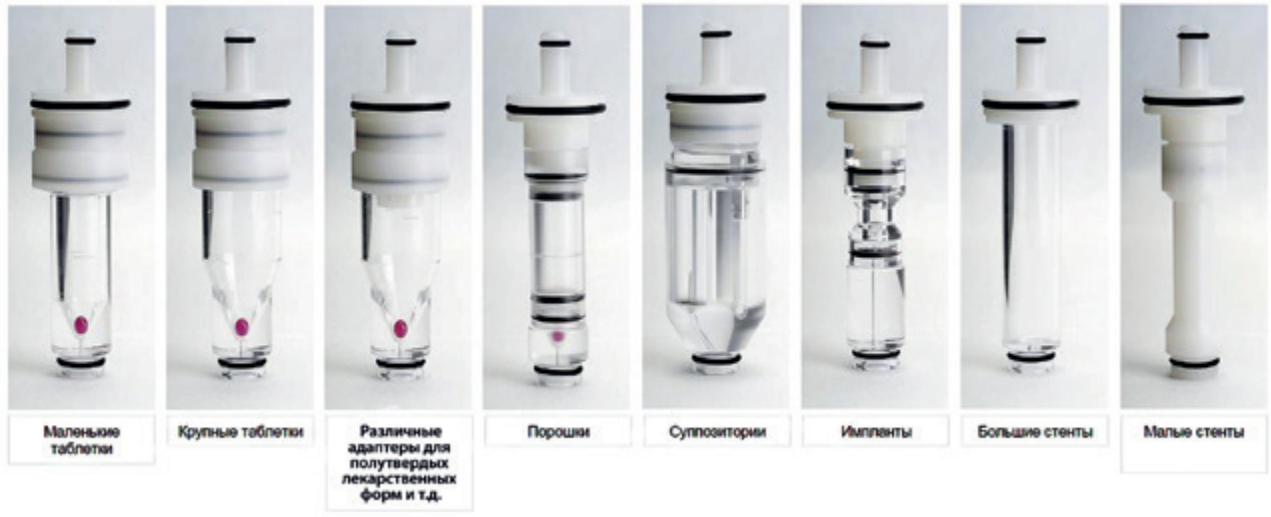
Суть метода «проточная ячейка» заключается в следующем: лекарственную форму помещают в ячейки небольшого объема с точно определенными размерами (различные типы ячеек под различные продукты). На дно ячейки кладется рубиновый шарик, который выступает в качестве обратного клапана, а также предотвращает блокирование канала ячейки стеклянными шариками при их использовании (используются для создания внутри ячейки ламинарного потока). Через ячейку с определенной скоростью прокачивается среда растворения. С определенной частотой осуществляется пробоотбор. Сами ячейки имеют водяную рубашку для поддержания постоянной температуры среды растворения.



Тестер «Проточная ячейка» Sotax CE7

Производители предлагают ячейки для исследования таблеток, капсул, порошков и гранулятов, имплантов, стентов, оптических линз, кремов и мазей и др. под конкретные задачи заказчика.

Тестирование некоторых видов продуктов связано с определенными сложностями ввиду специфики данных продуктов. Тестер «Проточная ячейка» позволяет решить большинство задач, стоящих при исследовании специфических продуктов.





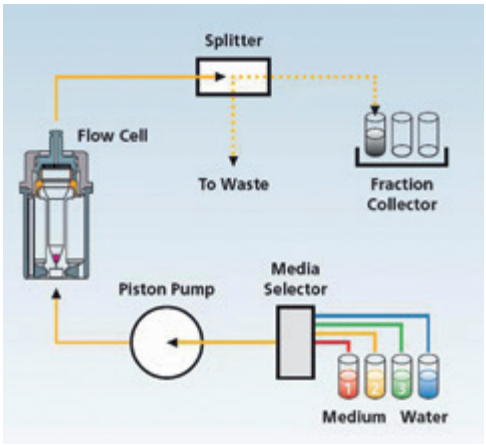
Тестер может работать по открытому и/или закрытому циклу (иметь открытую и/или закрытую конфигурацию).

В закрытом цикле насос прокачивает определенный объем среды растворения (от 15 до 4000 мл) через испытуемый образец в ячейке.

В открытом цикле мы прокачиваем растворитель через образец по незамкнутому циклу. Отработанная среда сливается в емкость для отходов, как показано в таблице 1.

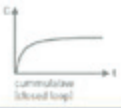
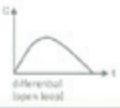
Основным достоинством открытого цикла является то, что имеется возможность смены среды растворения (изменение pH). Системы с открытой конфигурацией рекомендуется использовать для плохо растворимых лекарственных препаратов или при необходимости изменения pH среды растворения. Кроме того, при тестировании препаратов с быстрым высвобождением, используя метод USP 4, можно более четко отследить поведение лекарственной формы на начальном этапе растворения в отличие от методов USP 1 и 2.

Закрытая система имеет конфигурацию, подобную методу с лопастной мешалкой, и ограниченный объем среды растворения. Высвободившийся препарат накапливается в течение долгого времени. Эта конфигурация используется для лекарственных про-



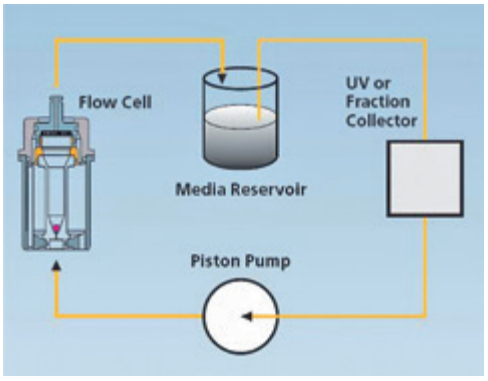
Конфигурация системы открытого цикла с возможностью смены pH и выбора среды растворения

Таблица 1.

ПАРАМЕТР	USP 1, 2	USP 4 (ЗАКРЫТЫЙ ЦИКЛ)	USP 4 (ОТКРЫТЫЙ ЦИКЛ)
Объем среды растворения	Постоянный	Постоянный	Изменяемый
Концентрация	Кумулятивная	Кумулятивная	Дифференциальная
Перемешивание	Корзинки / лопасть	Поток жидкости (насос)	Поток жидкости (насос)
Испарение	Испарение среды может быть минимальным при использовании специальной конструкции тестера	Низкий уровень испарения (закрытая емкость со средой)	Нет испарения (нет поверхности для испарения)
Схема работы			
Профиль растворения			

дуктов с очень низкой дозировкой и, по существу, может выполнять растворение в очень малых объемах среды.

В настоящее время несколько производителей предлагают тестеры «Проточная ячейка». Однако подавляющее большинство установленных в мире систем – это тестеры швейцарской компании Sotax AG, поскольку системы данного производителя доказали свою работоспособность и надежность.



Конфигурация системы закрытого цикла со спектрофотометром

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду многообразия инструментов и методов для анализа одних и тех же продуктов крайне важно подобрать наиболее подходящий с точки зрения достоверности результатов и наименее затратный для каждого конкретного продукта. Также необходимо четко определиться с уровнем автоматизации процесса с учетом будущего наращивания объемов производства и перевода всей отчетной документации в электронный вид. Приобретение оборудования с учетом потребностей завтрашнего дня позволит сэкономить компании значительные суммы на технологическом перевооружении в будущем. Также высокотехнологичное оборудование позволит компании оставаться конкурентоспособной при общей тенденции на рынке к автоматизации производственных процессов и переходе на электронный документооборот.



Agilent

Trusted Answers



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СЕЛЕКТИВНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И МАКСИМИЗАЦИИ ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРОФИЛЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ ПРИ ПОМОЩИ УВЭЖХ (UHPLC)

АВТОРЫ

J. Siji,

Agilent Technologies, Inc.
Бангалор, Индия

D. Hua,

Agilent Technologies, Inc.
Санта-Клара, Калифорния

ВЕДЕНИЕ

Аналитические методы для проверки чистоты активных фармацевтических ингредиентов описаны в фармакопеях. ВЭЖХ-УФ-детектирование является наиболее распространенным методом аналитической жидкостной хроматографии для профилирования примесей в лабораториях контроля качества ввиду простоты его использования и надежности. Тем не менее существует множество случаев, когда ультрафиолетовое (УФ) детектирование имеет ограничения, в том числе случаи, когда примеси имеют плохую УФ-поглотительную способность, совместное пиковое элюирование или неизвестные элементы нуждаются в проведении анализа, особенно если необходимо исследовать результаты вне спецификации (OOS). Кроме того, продукты разложения могут быть значительно менее УФ-активными, чем активные фармацевтические ингредиенты (АФИ) из-за потери хромофора. В данных ситуациях использование массового детектора последовательно с УФ-детектором значительно повышает достоверность результатов анализа. В данной статье продемонстрированы преимущества детектирования массы для однозначной идентификации пиков, определения соединений со слабым поглощением УФ и библиотеки химических препаратов для дальнейшего подтверждения при помощи системы Infinity Lab LC/MSD XT.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Эналаприла малеат (рисунок 1) используется для лечения гипертонии, симптоматической сердечной недостаточности и бессимптомной дисфункции левого желудочка (рисунок 1).

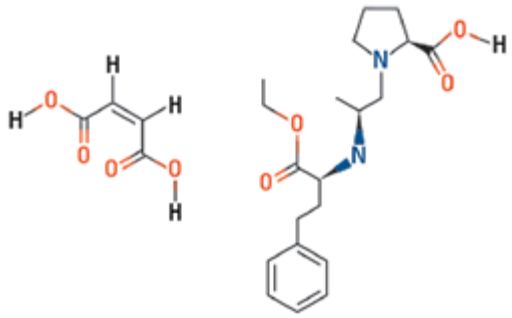


Рисунок 1. Химическая структура эналаприла малеата

Фармакопеи США и Европы рекомендуют к использованию аналитические системы для повседневного профилирования примесей эналаприла малеата, которые представляют собой системы жидкостной хроматографии (LC) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Существует девять структурно связанных известных примесей для эналаприла малеата. Обычно содержание примесей сравнивается с процентным содержанием основного активного фармацевтического ингредиента (АФИ). Для УФ-детектирования используется малая длина волны в 215 нм ввиду того, что отсутствуют существенные УФ-активные хромофоры для эналаприла малеата и его структурно подобных примесей. Процентные расчеты площади известных и неизвестных примесей из УФ-следов являются достаточно сложными, так как целевые участки недостаточно чувствительны к УФ-излучению. Поэтому определение чистоты, основанной только на области УФ-пика, может быть неоднозначным и сомнительным.

Использование одиночного квадрупольного (SQ) массового детектирования помогает решить данные аналитические задачи в обычной фармацевтической лаборатории. Система Agilent LC/MSD XT (масс-селективный детектор) с размером основания, подобным типичной системе ВЭЖХ, была специально разработана для легкой интеграции в хроматографический процесс. Данные масс-спектрометрии обеспечивают уверенное обнаружение и идентификацию менее УФ-активных соединений и загрязняющих примесей эналаприла малеата. В этой статье рассматриваются преимущества использования селективного массового детектирования для ежедневного профилирования примесей в лабораториях контроля качества.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стандарты и химикаты

Стандарты метанола, муравьиной кислоты и эналаприла малеата были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Санта-Клара, Калифорния). Во всех экспериментах использовалась вода Milli-Q (Merck, Германия). Все остальные химикаты, используемые для проведения исследования, были приобретены у компании Sigma-Aldrich.

Приборы

Были использованы LC/MSD-системы, которые состояли из следующих модулей.

- Насос для двухкомпонентных смесей Agilent 1260 Infinity II (G7112B).
- Пробоотборник Agilent 1260 Infinity II (G7129A).
- Детектор на диодной матрице Agilent 1260 Infinity II (G7117C).
- Система Agilent Infinity Lab LC/MSD XT с опцией ESI-AJS (G6135C).

Программное обеспечение Agilent V OpenLAB CDS использовалось для сбора, обработки и генерирования отчетов. ПО OpenLAB CDS обладает рядом функций, которые поддерживают целостность данных в соответствии с US FDA 21 CFRB Part 11, EU 11 и другими стандартами.

Системы Agilent 1260 Infinity II LC и Agilent LC/MSD XT предназначены для обеспечения надежной и эффективной обработки данных LC/MS в обычных сферах применения.

Параметры метода

В рекомендованных фармакопеей методах хроматографического анализа примесей используются подвижные фазы, несовместимые с MS (МС). Для этого эксперимента был разработан MS-совместимый метод с использованием системы метанола и воды. В таблицах 1 и 2 перечислены параметры приборов LC и MS.

Процедура

Один микролитр образца эналаприла малеата в концентрации 1000 мкг/мл в метаноле вводили в систему LC/MS. Для поддержания производительности прибора с высокой концентрацией активного фармацевтического ингредиента АФИ элюент колонки после УФ-детектирования был отведен в отходы во время элюирования основного пика АФИ при помощи клапана отвода. Обнаруженные примеси LC/MSDB XT сравнивались с записями внутренней библиотеки для того, чтобы подтвердить их идентичность.

Таблица 1.

Параметры метода Agilent 1260 Infinity II LC

Параметр	Установленное значение
Колонка	Agilent Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 2,1×50 мм, 2,7 мкм при 55 °C
Подв. фаза A	0,1% муравьиная кислота в воде
Подв. фаза B	0,1% муравьиная кислота в метаноле
Градиент	Время B%
	0 20 1 20 12 90
Прогон	3 мин
Скорость потока	0,8 мл/мин
Вводимый объем 1 мкл, промывка иглы метанолом, порт промывки активен 7 секунд	
Детекирование УФ	215 нм
Скорость сбора	40 Гц
Детектирование МС	
Диапазон массы	65–600 m/z
ΔEMV	250 В
Время сканирования	200 мс
Напряж. фрагм.	125 В

Таблица 2.

Параметры Agilent LC/MSD XT AJS

Параметр	Установленное значение
Источник иона	AJS ESI
Полярность	Позитивная
Фильтр пика	0,02 мин
Время выдержки	30 мс
Темп. сушильного газа 250 °C	
Пот. сушильного газа	7 л/мин
Темп. защитного газа 300 °C	
Пот. защитного газа	10 л/мин
Давление небулайзера	30 psig
Поз. напр. капилляра 1,500 В	
Объем патрубка	0 В
Клапан. отв. к отх.	от 3,39 до 3,99 мин

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-детектирование является неточным для примесей со слабыми хромофорами

На рисунке 2 изображен профиль элюирования образца эналаприла малеата, основанный на полученных УФ-данных. Данные УФ-детектора показали наличие в образце семи пиков примесей, в то время как чистота площади беспримесности в процентах активного фармацевтического ингредиента АФИ составила 98,7%. УФ-чувствительность АФИ, а также его примесей была очень низкой, что ограничивало возможность точного идентифицирования примесисей при низких концентрациях по сравнению с АФИ.

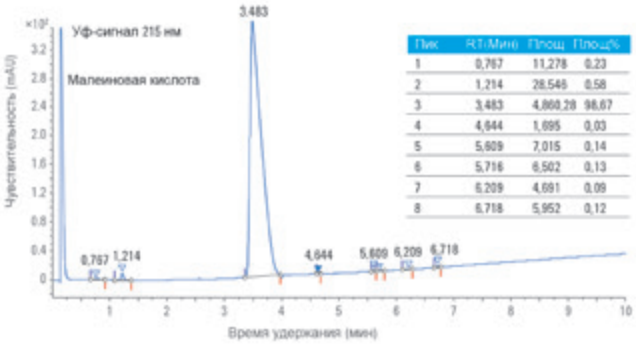


Рисунок 2. Профиль элюирования ЖХ/УФ эналаприла малеата при 215 нм. Концентрация АФИ 1,000 мкг/мл показывает только ~350 mAU, что подтверждает низкое УФ-поглощение

Профиль элюирования MSD

Плохая УФ-чувствительность образца эналаприла малеата может быть устранена при помощи масс-спектрометрии, основанной на детектировании. Мы использовали компактный масс-селективный детектор Agilent LC/MSD XT для эффективного отслеживания компонентов образца на основе их массы после хроматографического элюирования. На рисунке 3 изображен отслеживаемый профиль элюирования с использованием LC/MSD XT. При помощи MSD удалось обнаружить еще два дополнительных пика, которые не наблюдались при УФ-детектировании.

Встроенный клапан отвода, который обеспечивает прочность системы

Спектральные данные МС облегчают обнаружение и подтверждение примесей с плохой УФ-чувствительностью. Однако повторные введения образцов с высокими концентрациями АФИ могут повлиять на медленное загрязнение источника ионизации МС. Данную задачу можно свести к минимуму при помощи встроенного клапана для отвода, который установлен в масс-спектрометрах Agilent.

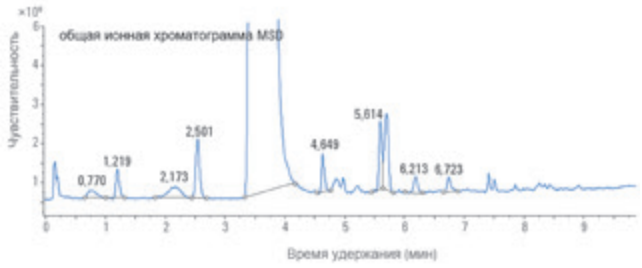


Рисунок 3. Общая ионная хроматограмма из МС-анализа эналаприла малеата. МС-детектирование позволило выявить дополнительные пики примесей. Например, при помощи MSD нам удалось обнаружить элюирование примесей на протяжении 2,501 мин, в то время как УФ-след не позволял этого сделать

Клапан может быть настроен таким образом, чтобы отводить поток элюента колонки в отходы во время элюирования высококонцентрированного основного пика (1000 мкг/мл). При разработке метода LC мы добились того, чтобы основные пики АФИ были значительно отделены от остальной части примесей. Переключение клапана для отвода очень плавное и позволяет поддерживать воспроизводимость времени удерживания (рисунок 4).

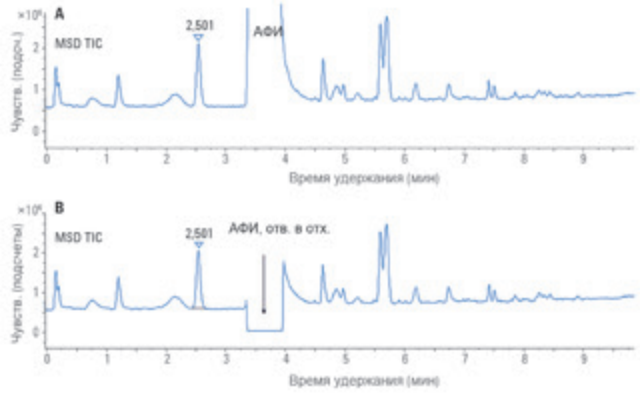


Рисунок 4. A) Трассировка эналаприла малеата при помощи LC/MSD XT TIC. B) Трассировка эналаприла малеата при помощи LC/MSD XT TIC с активным клапаном для отвода позволяет направлять пик АФИ с высокой концентрацией в отходы. Превосходная воспроизводимость времени удержания подтверждает плавную работу клапана для отвода

LC/MSD XT определяет УФ-нечувствительные примеси

Эналаприла малеат и связанные с ним примеси хорошо ионизировались и детектировались при помощи системы Agilent LC/MSD XT. При помощи MS были обнаружены две новые существенные примеси, которые не могли быть обнаружены при помощи УФ-поглощения. Например, было обнаружено, что одна новая примесь элюируется через 2,5 мин. Величина m/z для этой примеси составляла 280 Da (на рисунке 5 изображена извлеченная ионная хроматограмма). Масс-спектральную информацию данной примеси сравнивали с ранее созданной пользовательской библиотекой примесей, которая связана с АФИ-примесями, после чего данная примесь была идентифицирована как примесь B (рисунок 6).

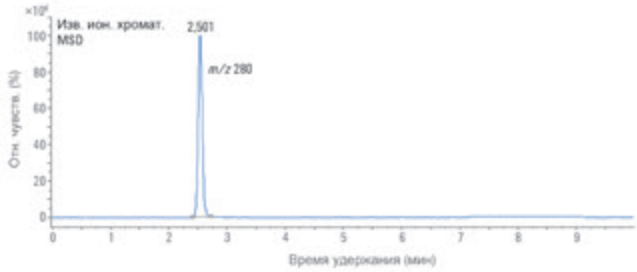


Рисунок 5. Извлеченная ионная хроматограмма примеси с m/z 280, элюирование через 2,5 мин. Данная примесь не была обнаружена при УФ-детектировании

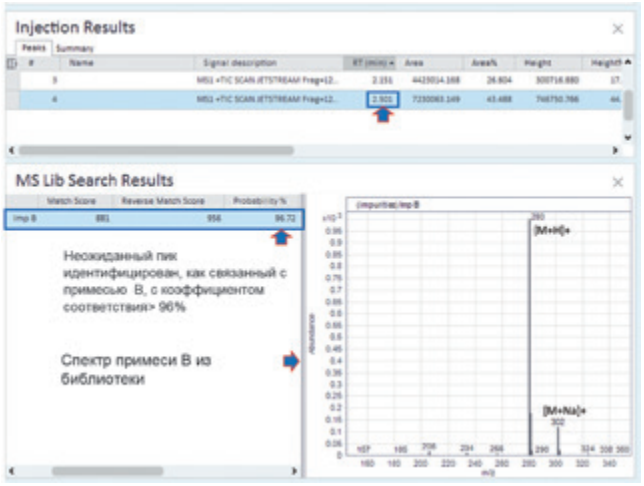


Рисунок 6. Результат поиска в библиотеке для примеси с m/z 280. Поиск в библиотеке m/z 280 привел к появлению примеси B с вероятностью >96%

Масс-спектрометрическое детектирование позволяет идентифицировать сопутствующие соединения

Совместная элюция пиков является проблемой при профилировании примесей и может привести к неправильной оценке чистоты АФИ.

Зачастую учитываются только формы хроматографических пиков, в то время как функция чистоты УФ-пика используется для сравнения спектров во время анализа LC-UV. Такой подход может потерпеть неудачу, если УФ-спектры пиков во время совместной элюции схожи. Данная проблема может быть решена использованием системы Agilent LC/MSD XT в сочетании с УФ-детектированием.

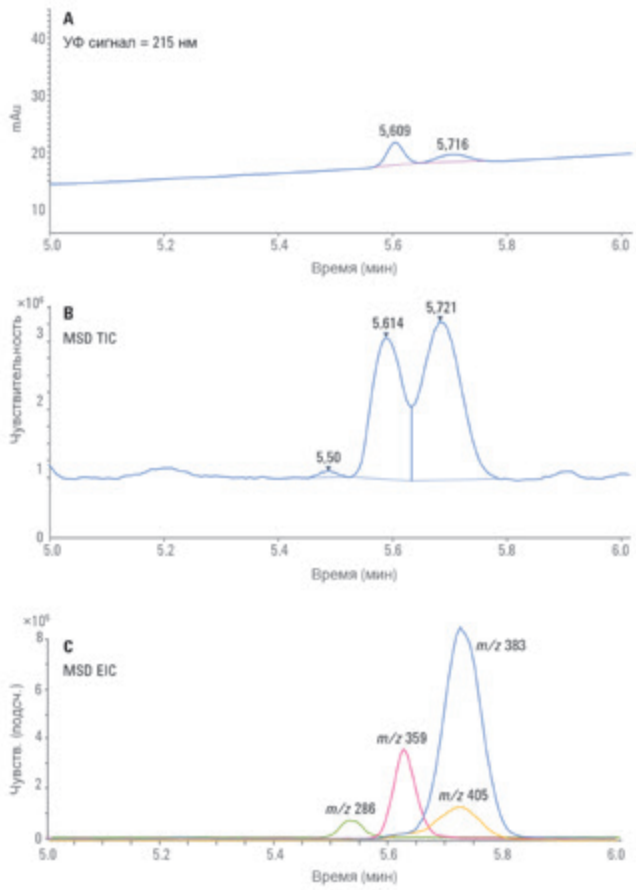


Рисунок 7. Детектирование массы облегчает идентификацию пиков, ненаблюдаемых при УФ-детектировании. A) Трассировка УФ-детектирования показывает два пика на 5,6 и 5,7 мин. B) Трассировка LC/MSD XT TIC позволила обнаружить дополнительную примесь низкого уровня в течение 5,5 мин. Спектральная оценка пика в течении 5,72 мин подтвердила совместную элюцию двух пиков с m/z 383 и m/z 405. C) Наложение EIC всех примесей, которые элюируются в пределах 5,5 и 5,7 мин

Для АФИ эналаприла малеата след после УФ-детектирования показал два относительно хорошо разделенных пика при 5,6 и 5,7 мин (рисунок 7A). Тем не менее спектральный анализ общей ионной хроматограммы LC/MSD XT следа показал наличие примесей в пределах 5,7-минутного пика (рисунок 7B). Экстрагированная ионная хроматограмма отдельных примесей четко показала совместную элюцию ожидаемых примесей (рисунок 7C). На рисунке 8 показаны наблюдаемые MSD-спектры примесей совместной элюции в пределах 5,7-минутного пика с разных временных точек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система Agilent LC/MSD XT вместе с УФ-детектором помогает избежать недопонимания и дает более высокую достоверность результатов профилирования примесей. Когда возникают сложные проблемы с детектированием примесей, например

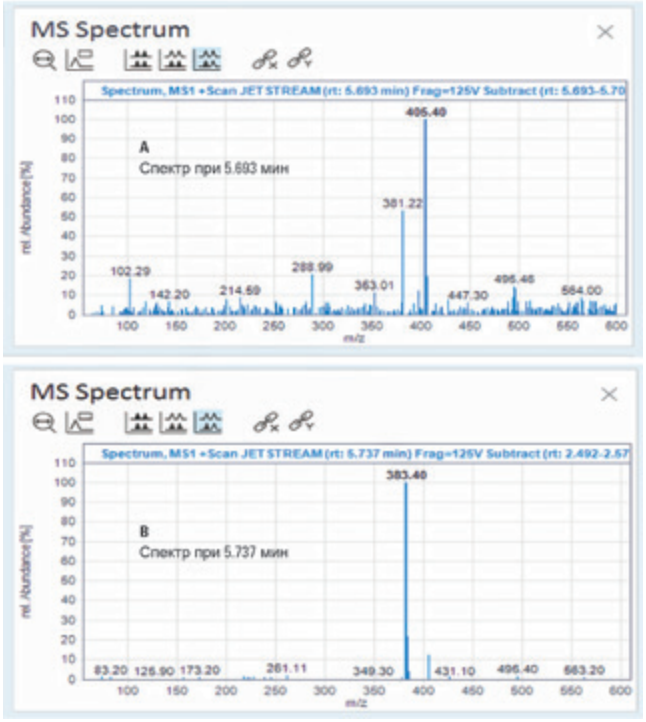


Рисунок 8. Наблюдаемые MC-спектры 5,7-минутного пика от следа общей ионной хроматограммы. Различные спектры из двух разных временных точек указывают на возможность совместного использования примесей. Спектр, соответствующий 5,693 мин, показывает наличие примеси с m/z 405,4 (A), а спектр MS, соответствующий 5,737 мин показывает присутствие примеси с m/z 383,4 (B)

усреднение значений пиков или плохое поглощение УФ-излучения, то информация о значениях массы, получаемая при помощи системы Agilent LC/MSD XT, позволяет повысить достоверность результатов профилирования примесей. Функции создания и поиска библиотек элементов, которые включены в программное обеспечение Agilent V OpenLAB CDS, помогают идентифицировать соединения в областях разработки лекарственных препаратов и в лабораториях контроля качества. Передовые технические системы управления, которые являются частью ПО OpenLAB CDS, позволяют поддерживать целостность данных в стационарной лаборатории обеспечения и контроля качества на фармацевтическом производства.

Agilent
Trusted Answers

ОПИСАНИЕ СОПРЯЖЕННЫХ АНТИТЕЛ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И НАЗНАЧЕНИЕ СОПРЯЖЕННЫХ УЧАСТКОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМЫ AGILENT 1290 INFINITY II 2D-LC С КВАДРУПОЛЬНОЙ LC/MS-СИСТЕМОЙ AGILENT 6530

АВТОРЫ

K. Sandra,
G. Vanhoenacker,
M. Steenbeke,
I. Vandenheede,
P. Sandra,

Исследовательский институт по хроматографии (RIC)
Кеннеди парк, 26, B-8500 Kortrijk, Бельгия

S. Schneider,
U. Huber,

Agilent Technologies, Inc.
Вальдброн, Германия

ВВЕДЕНИЕ

Конъюгаты антител с лекарственным препаратом (ADCs) – это многообещающий новый класс биофармацевтических препаратов. Тем не менее сложность структуры конъюгатов ADCs ограничивает возможности использования передовых хроматографических систем и масс-спектрометров. В данной статье описана возможность определения участков конъюгатов в лекарственном препарате при помощи жидкостного хроматографа 2D-LC [RPLC×RPLC (общефазовая жидкостная хроматография)] и методов масс-спектрометрии высокого разрешения. Жидкостный хроматограф Agilent 1290 Infinity II 2D-LC использовался вместе с квадрупольной системой Agilent 6530 ЖХ/МС.

Моноклональные антитела (mAbs) являются чрезвычайно важными биофармацевтическими препаратами [1, 2].

Успех использования моноклональных антител mAbs спровоцировал дальнейшее развитие различных форматов следующего поколения. Например, в онкологии конъюгаты антител с лекарственным препаратом (ADCs) являются очень перспективными, поскольку они синергетически комбинируют конкретные моноклональные тела mAb вместе с биологически активным цитотоксическим веществом при помощи стабильного связующего агента [3–5]. На сегодняшний день

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

на рынке представлены два вида конъюгатов ADCs – брентуксимаба ведотин (Adcetris) и адо-трастузумаба эмтанзин, в то время как еще 30 видов проходят стадии клинических испытаний [3–5]. С конструктивной точки зрения конъюгаты ADCs являются чрезвычайно сложными ввиду того, что гетерогенность исходного антитела накладывается на изменчивость стратегии сопряжения. Обычно сопряжение происходит на аминогруппах остатков лизина или же на сульфгидрильных группах межцепочечных остатков цистеина, как в случае с адо-трастузумаба эмтанзином и брентуксимаб ведотином соответственно (рисунок 1). С лизином 80–100 и всего лишь с восемью остатками межцепочечного цистеина сопряжение лизина дает более гетерогенную смесь видов по сравнению с сопряжением цистеина, несмотря на аналогичный общий уровень лекарственных препаратов, вводимых на антитело (от 0 до 8 со средним значением от 3 до 4) [3–5].

Во время проведения анализа данных молекул необходимо определить все характеристики типичных моноклональных антител mAb. Например, последовательность аминокислоты и ее состав, молекулярную массу, N-гликозилирование, N- и C-терминальную обработку, S-S-перемычки, свободные остатки цистеина, дезамидирование, изомеризацию аспартата, окисление и варианты последовательности. В дополнение ко всему необходимо определить критические атрибуты качества, такие как соотношение между лекарственными препаратами и антителами (DAR), распределение лекарственного препарата, а также точки сопряжения. В данной статье описаны возможности определения точек сопряжения при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1290B Infinity II 2D-LC, который работает в режиме LCxLC (ЖХхЖХ), и квадрупольной системы Agilent 6530B Quadrupole (Q-TOF) ЖХ/МС.

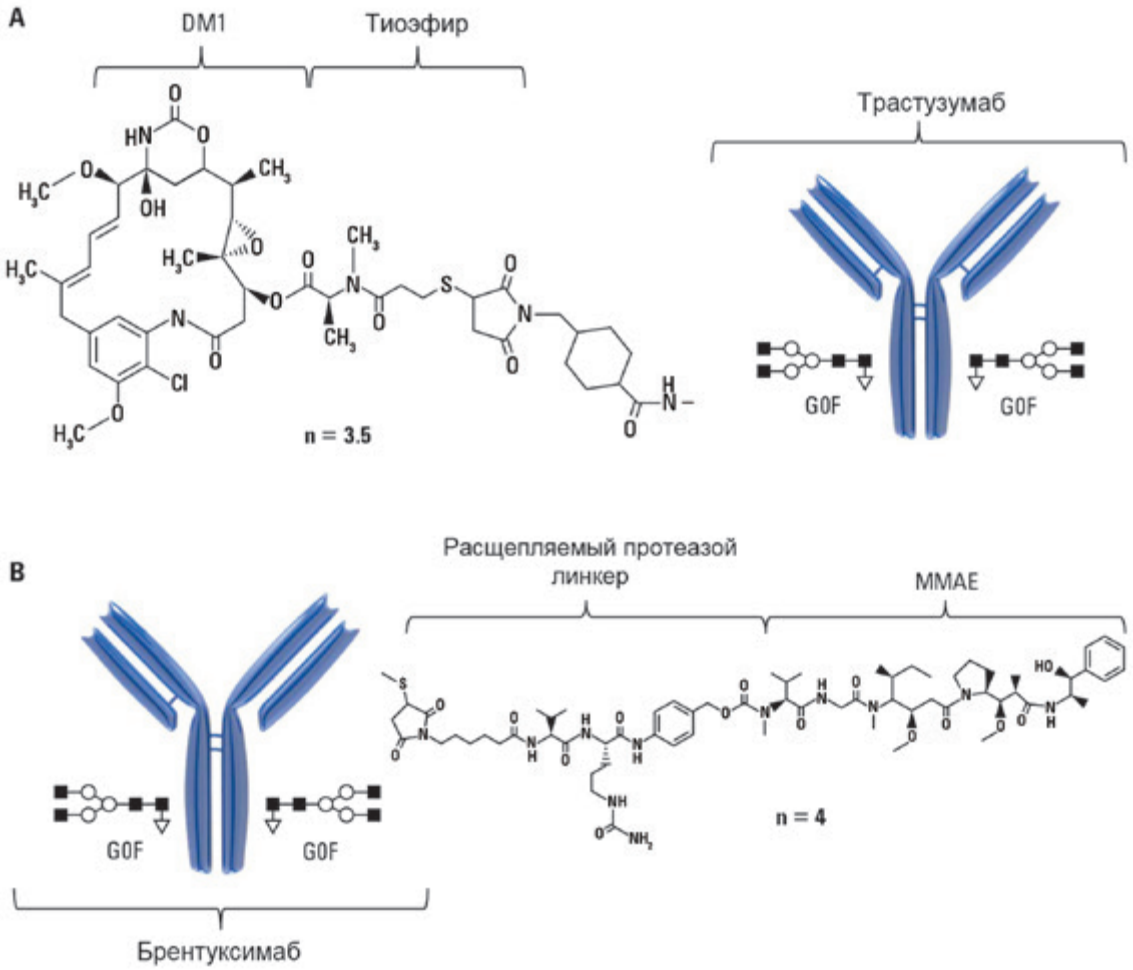


Рисунок 1. A) Строение адо-трастузумаба эмтанзина (Kadcyla), который состоит из трастузумаба антител anti-HER2 («Герцептин») с цитоксической микротрубчатой ингибирующей производной майтанзина DM1, сопряженной с остатками лизина при помощи невосстанавливаемого тиоэфирного линкера. DM1 сопряжен со средним значением 3,5B лекарственных препаратов на одно антитело. B) Строение брентуксимаба ведотина (Adcetris), состоящего из антитела брентуксимаба anti-CD30 с антимитотическим лекарственным средством монометилауристатин E (MMAE), сопряженным с межцепочечными остатками цистеина посредством линкера ванил-цитруллина с расщепляемым катепсином. MMAE сопрягают со средним значением 4,0 лекарственного препарата на одно антитело

Двумерная жидкостная хроматография в режиме онлайн (2D-LC) – это новый аналитический инструмент анализа биофармацевтических препаратов. По сравнению с одномерной жидкостной хроматографией LC двумерная 2D-LC [в особенности 2D-LC (LC×LC)] может значительно увеличить предел хроматографического пика, если два измерения являются ортогональными, в то время как разделение, установленное в первом измерении, достигается при переходе ко второму измерению. В последние годы двумерная жидкостная хроматография LC×LC успешно используется в пептидном картировании [7–11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛЫ

Ацетонитрил, метанол, муравьиная кислота

Ацетонитрил, метанол, муравьиная кислота и вода были приобретены у компании Biosolve (Нидерланды). Трифторуксусная кислота, дитиотреитол (DTT), иодацетамид (IAM), бикарбонат аммония и фосфорная кислота были приобретены у компании Sigma-Aldrich (США), модифицированный трипсин для секвенирования – у компании Promega (США), Трис-HCl – у Thermo Fisher Scientific (США), Rapigest – у Waters (США), «Герцептин» и «Кадцила» приобретались у Roche (Швейцария), а «Адцетрис» – у компании Seattle Genetics (США).

Подготовка образца

К объему, соответствующему 100 мкг белка, было добавлено 105 мкл 0,1% Rapigest в 100 мМ Трис-HCl с pH 8 с последующим добавлением 100 мМ Трис-HCl с pH 8 с конечным объемом 192,5 мкл. Далее образец восстанавливался при температуре 60°C в течение 30 мин путем добавления 5 мМ DTT (2,5 мкл 400 мМ DTT в 100 мМ Трис-HCl), после чего был алкализирован при температуре 37 °C в течение 1 ч путем добавления 10 мМ IAA (5В мкл 400 мМ IAA в 100 мМ Трис-HCl). Усвоение длилось на протяжении 16 ч при температуре 37 °C с использованием трипсина в качестве протеазы, добавленной при соотношении фермента к субстрату 1:25 (в пересчете на массу). Лиофилизированный трипсин (20 мкг), растворенный в 100 мМ Трис-HCl (50 мкл), добавляли в объеме 10 мкл, что обеспечило конечный объем образца 210 мкл.

Хроматограф 2D-LC (2D-ЖХ)

Был использован хроматограф Agilent 1290 Infinity II 2D-LC в следующей конфигурации:

- высокоскоростной насос Agilent 1290 Infinity II с опцией промывки прокладок (первое измерение) (G7120A);
- высокоскоростной насос Agilent 1290 Infinity II (второе измерение) (G7120A);
- мультисемплер Agilent 1290B Infinity II (G7167B);
- многоколонный термостат Agilent 1290B Infinity II (G7116B);
- привод клапанов Agilent 1290 Infinity (G1170A);
- двойной двунаправленный клапан с 4 портами для 2D-ЖХ с двумя контурами на 40 мкл (G4236A);
- квадрупольная ЖХ/МС-система с точным измерением массы Agilent 6530 (G6530A).

Параметры метода LC×LC (ЖХхЖХ)

RPLC×RPLC	
Первое измерение	
Колонка	Agilent ZORBAX Bonus-RP, 2,1×150, 3,5 мкм
Раствор А	10 мМ NH_4HCO_3, pH 8,2
Раствор В	MeOH:ACN 50:50
Скорость потока	80 мкл/мин
Градиент	от 0 до 45 мин – от 2 до 92%В от 45 до 46 мин – от 92 до 100%В от 46 до 55 мин – 100 %В Время перерыва – 9 мин при 2%В
Температура	23 °C
Второе измерение	
Колонка	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6×50 мм, 3,5 мкм
Раствор А	0,1% H_3PO_4 в воде (УФ) или 0,1% HCOOH в воде (МС)
Раствор В	ACN
Скорость потока	3,5 мл/мин
Скор. потока в игле	0,5 мл/мин
Первоначальный градиент	от 0 до 0,35 мин – от 2 до 10%В от 0,35 до 0,40 мин – 2%В (время модуляции)
Модуляция градиента	С постоянным сдвигом %В и Δ%В от 2%В при 0 мин до 2%В в течение 49 и до 95%В в течение 50 мин от 10%В при 0,35 мин до 80%В в течение 49 мин
Температура	55 °C
Модуляция	
Модуляция	От 4 до 49 мин
Контуры	Два контура по 40 мкл, одновременная конфигурация
Время модуляции	0,40 мин
Введение	
Объем	От 8 до 15 мкл (УФ), 8 мкл (МС)
Температура	4 °C
Промывка иглы	Промывка 6 с через порт (50% ACN)
Определение УФ	
Длина волны	Сигнал 214/4 нм, 248/4 нм, 252/4 нм, эталон 360/100 нм
Скор. перед. данных	80 Гц
Определение МС	
Ионизация	Технология реактивного потока Agilent Jet Stream, позитивная ионизация
Сушильный газ	350 °C, 11 л/мин

Небулайзер	55 psig (фт/кв. дюйм изб.)
Защитный газ	400 °C, 9 л/мин
Напряжение капилляра	3,500 В
Напряжение патрубка	1,000 В
Фрагментор	175 В
Захват	Расширенный динамический диапазон (2 ГГц)

Разрешение	10,000 для m/z 1,000
MC	8 спектров
Все ионы MC/MC	8 спектров при энергии столкновения 20 или 40 Иформ.-завис. MC/MC 8 спектров
MC/MC-порог (Abs)	1,000
Ширина изоляции	~4 m/z
Энергия столкновения	(3,6*m/z)/100-4

ПО

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation версия C.01.07 с дополнением 2D-LC версии A.01.02.
- Agilent MassHunter для управления системой (B05.01).
- Agilent MassHunter для анализа данных (B07.00).
- ПО Agilent BioConfirm для MassHunter (B07.00).
- ПО GC Image LC×LC Edition для анализа данных 2D-LC (GC Image, LLC., Линкольн, NE, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 2A и 2B показаны УФ 214 нм ЖХхЖХ триптические пептидные карты трастузумаба (Herceptin) и адо-трастузумаба эмтанзина (Kadcyla).

Ортогональность в основном направлена на подвижную фазу pH и цвиттер-ионную природу пептидов. Частичная корреляция, которая имеет место быть, блокируется высокой пиковой емкостью.

Использование сдвигающего второго градиента с увеличением силы элюирования в качестве функции анализа времени дополнительно увеличивает поверхностное покрытие и, следовательно, конечную пиковую емкость.

Ввиду того, что Herceptin и Kadcyla имеют одну и ту же аминокислотную последовательность, большая часть пептидной карты является идентичной. Вы можете наблюдать дифференцирующие пятна, которые расположены в правом верхнем углу участка Kadcyla, который отображает самую гидрофобную часть. По-

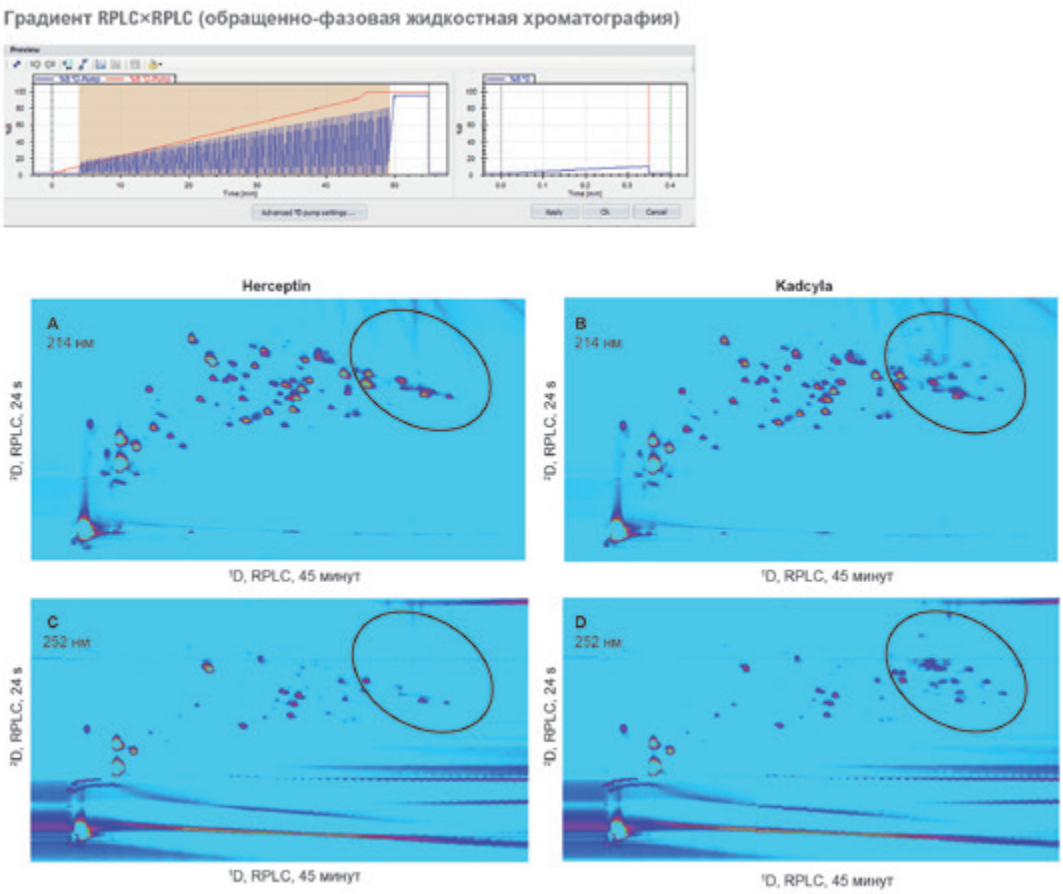


Рисунок 2. Пептидные карты RPLC×RPLC Herceptin (A,C) и Kadcyla (B,D), полученые при 214 и 252 нм УФ

поскольку сопряжение лекарственных препаратов делает пептиды более гидрофобными, то ожидается, что эти пятна будут соответствовать сопряженным пептидам. Лекарственный препарат обладает максимальным поглощением УФ при длине волны 252 нм. Поэтому эту длину волны можно использовать для подтверждения позиционирования сопряженных пептидов на карте пептидов. На рисунках 2C и 2D верхний правый угол участка становится более интенсивным в случае использования Kadcyla, что делает его мощным ЖХ×ЖХ-инструментом выделения сопряженных пептидов.

Для того чтобы выявить идентичность данных пептидов, методология RPLC×RPLC была объединена с МС и МС/МС. Для анализа МС фосфорная кислота была заменена муравьиной кислотой в качестве добавки подвижной фазы во втором измерении. На рисунках 3A и 3B показаны триптические пептидные карты RPLC×RPLC-MC Herceptin и Kadcyla. В таблице 1 приведен набор идентифицированных сопряженных пептидов. На рисунке 4 показан спектр МС/МС, соответствующий сопряженному пептиду TKPR. Данный спектр, а также, в свою очередь, все спектры МС/МС, связанные с сопряженными пептидами DM1, сильно заполнены фрагментами лекарственных препаратов, например при m/z 547,2206. Аналогично УФ-сигналу при 252 нм данный ион можно использовать для распознавания сопряженных пептидов на картах ЖХхЖХ/МС. Для распознавания система Q-TOF ЖХ/МС может работать в режиме всех ионов МС/МС, что, в свою очередь, означает, что квадруполь работает только в режиме радиочастот, тем самым перенося все пептиды в ячейку столкновения, где происходит диссоциация, обусловленная столкновением. Как показано на рисунках 3C, 3D, 3E и 3F, при извлечении из данных отдельного ионного фрагмента DM1 при m/z 547,2206 с высокой точностью массы верхний правый угол двумерной пептидной карты становится более интенсивным в случае использования Kadcyla по сравнению с Herceptin. Последний график будет пустым, что наглядно демонстрирует селективность, обусловленную данной функциональностью МС/МС по сравнению с определением УФ при 252 нм. На рисунках 3C и 3D приведены данные о всех ионах МС/МС, полученные при использовании энергии столкновения 20 эВ. На рисунках 3E и 3F приведены данные, полученные при более высокой энергии столкновения 40 эВ. Наличие дополнительной информации обусловлено использованием двух различных значений энергии столкновения.

Аналогичная стратегия была использована для выявления областей сопряжения на брентуксимаба ведотине (Adcetris), межцепочечный цистеин-сопряженный ADC. При наличии только восьми остатков (по четыре на каждую половину антитела), доступных для сопряжения, использование Adcetris является более простым по сравнению с Kadcyla. На рисунках 5A и 5B показаны триптические пептидные карты RPLC×RPLC Adcetris, полученные при УФ-определении с использованием длин волн 214 и 248 нм, причем последняя длина волны является более селективной по отношению к MMAE-сопряженным пептидам. Три интенсивных пятна, расположенных в верхнем правом углу пептидной карты, становятся светлее на участке 248 нм и, как ожидается, будут соответствовать сопряженным пептидам.

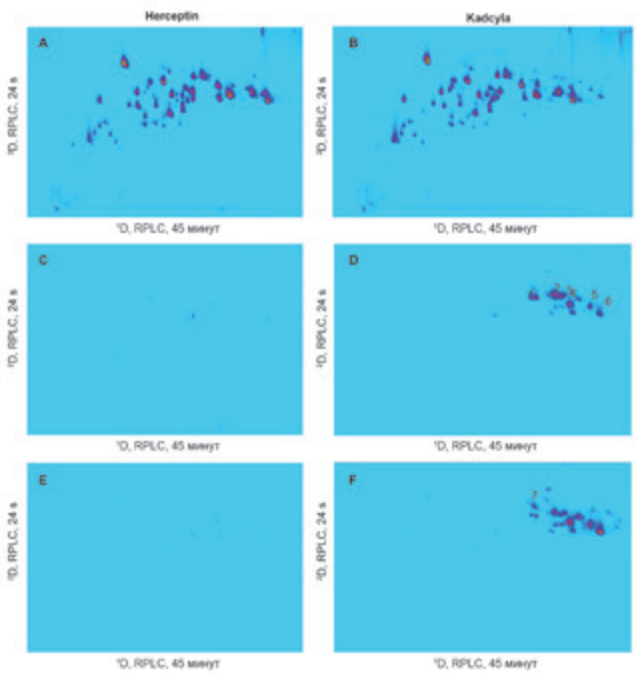


Рисунок 3. RPLC×RPLC-MC пептидные карты Herceptin (A), Kadcyla (B) и RPLC×RPLC MC/MC пептидные карты всех ионов Herceptin (C,E) и Kadcyla (D,F), показывающие экстрагированный ион при m/z 547,22056 (экстрагирован при 20 ppm точности массы). Энергия столкновения составляла 20 эВ (C,D) и 40 эВ (E,F) соответственно. В таблице 1 приведены особенности вышеприведенных пятен

Таблица 1.

Выбор сопряженных пептидов, соответствующих аннотированным пятнам на пептидной карте ЖХ×ЖХ, которая показана на рисунках 3D и 3F. Сопряженные остатки лизина подчеркнуты в таблице

№	Цепочка	Расп. послед.	Последовательность
1	Lc	184–190	ADYE**K**HK
2	Hc	292–295	T**K**PR
3	Hc	413–419	LTVD**K**SR
4	Hc	222–251	SCD**K**THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP**K**PK*
5	Hc	20–38	LSCAASGFNI**K**DTYIHWVR
6	Hc	305–325	VVSVLTVLHQDWLNG**K**EY**K**CK*
7	Hc	259–291	TPRVTCVVVDVSHEDPEV**K**FNWYVDGVEVHNAK

Примечание: *Две потенциальные области сопряжения.

На рисунке 6A изображена триптическая пептидная карта RPLC×RPLC/MS Adcetris. Спектр МС/МС, связанный с MCDE-сопряженным пептидом SCDK, изображен на рисунке 7. Аналогично DM1-сопряженным пептидам MMAE-сопряженные пептиды также содержат специфические ионы, происходящие из цитоток-

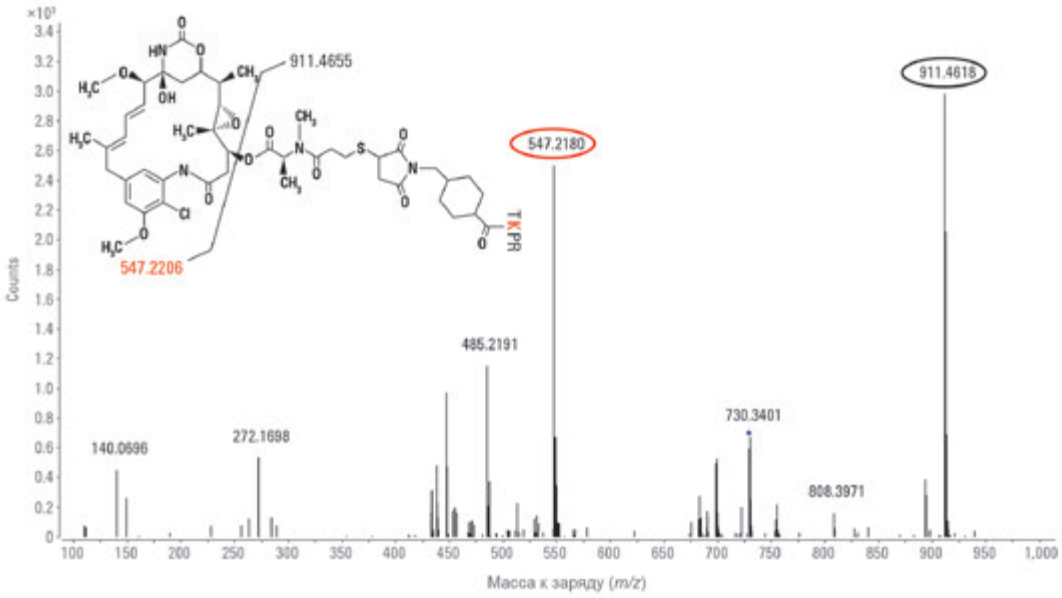


Рисунок 4. **Спектр MS/MS, связанный с дважды заряженным DM1-сопряженным пептидом TKPR при m/z 729,3411**

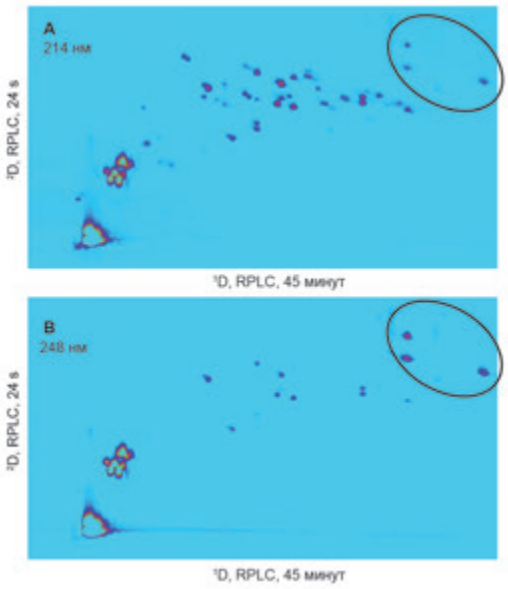


Рисунок 5. **Пептидные карты RPLC×RPLC Adcetris, полученные при длинах волн 214 нм (A) и 248 нм УФ (B)**

сической молекулы при m/z 718,5113. Как показано на рисунках 6B и 6C, данные ионы могут быть экстрагированы из данных всех ионов MC/MC, что, в свою очередь, позволяет распознавать сопряженные пептиды на двумерных графиках. В таблице 2 приведен набор идентифицированных сопряженных пептидов. Особый интерес представляет обнаружение сопряженных внутрицепочечных цистеиновых остатков, например пептид тяжелой цепи NQVSLTCLVK (пик 3 на рисунке 6C). Эти внутрицепочечные остатки не направлены на выработку ADC. По-видимому, этап снижения TCEP применяется к mAb до того, как сопряжение приводит к уменьшению коллатерального дисульфидного

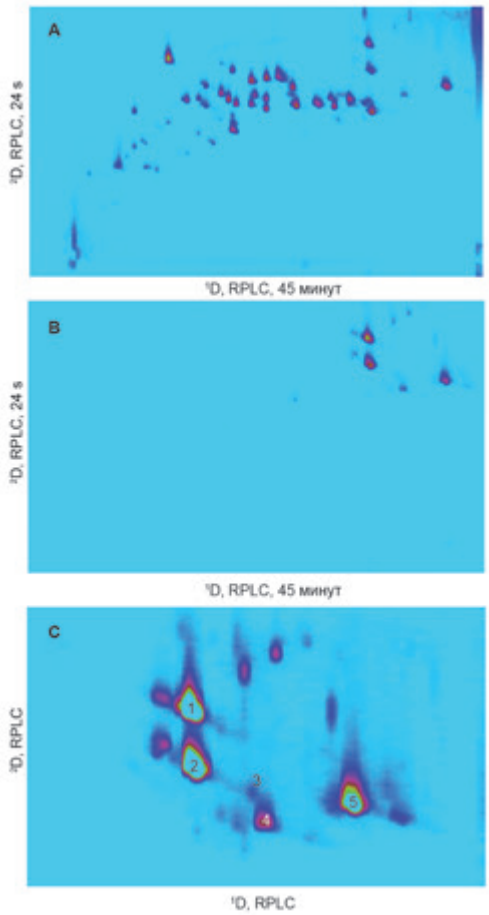


Рисунок 6. **Пептидная карта RPLCxRPLC-MS Adcetris (A) и пептидная карта метода всех ионов RPLCxRPLC MS/MS (B,C), отображающие экстрагированный ион m/z 718,5113 (экстрагированный при 20 ppm точности массы). Энергия столкновения составляла 20 эВ. B) Полный график; C) Увеличенный график. В таблице 2 приведены особенности вышеприведенных пятен**

мостика наряду с межцепочечным снижением (последние звенья являются наиболее неустойчивыми). Полученные свободные тиольные группы могут затем взаимодействовать с легко расщепляемым протеазой добавкой линкера-MMAE.

Данные нежелательные побочные продукты обнаруживаются только на остаточном уровне, что свидетельствует об аналитической чувствительности представленной методологии.

Таблица 2.

Выбор сопряженных пептидов, соответствующих аннотированным пятнам на пептидной карте ЖХхЖХ, которая отображена на рисунках 6B и 6C. Сопряженные цистеиновые остатки подчеркнуты. Полезная нагрузка: MMAE + линкер. Карбамидометилирование является результатом алкилирования

№	Цепочка	Расп. послед.	Последовательность
1	Lc	216–218	GEC + полезная нагрузка
2	Hc	219–222	SCDK + полезная нагрузка
3	Hc	361–370	NQVSLTCLVK + полезная нагрузка
4	Hc	223–248	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK + 1* пол. нагр. и +1* Карбамидометилирование
5	Hc	223–248	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK + 2* пол. нагр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система Agilent 1290 Infinity II 2D-LC в сочетании с квадрупольной системой LC/MS Agilent 6530 позволяет аккуратно и точно идентифицировать сопряженные пептиды в ADC. Учитывая надежность современных систем 2D-LC/MS, данные измерения могут быть реализованы за пределами проводимого исследования в привычной среде анализа и контроля качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization // J. Chromatogr. A 2014. № 1335. P. 81–103.
2. S. Fekete et al. Chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals // Anal. Chem. 2016. № 88. P. 480–507.
3. S. Panowski et al. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy // mAbs. 2014. № 6. P. 34–45.
4. A. Wakankar et al. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates // mAbs. 2011. № 3. P. 161–172.
5. A. Beck, J.M. Reichert. Antibody-drug conjugates // mAbs. 2014. № 6. P. 15–17.
6. K. Sandra, P. Sandra. The opportunities of 2D-LC in the analysis of monoclonal antibodies // Bioanalysis. 2015. № 7. P. 2843–2847.
7. K. Sandra et al. Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine // J. Chromatogr. B. 2016. № 1032. P. 119–130.
8. G. Vanhoenacker et al. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of therapeutic monoclonal antibody digests // Anal. Bioanal. Chem. 2015. № 407. P. 355–366.
9. G. Vanhoenacker et al. Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution / Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-2880EN. 2013.
10. G. Vanhoenacker et al. Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. Part 2: HILIC×RPLC-MS / Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-4530EN. 2014.
11. K. Sandra et al. Identifying monoclonal antibody mutation sites using the Agilent 1290 Infinity II 2D-LC solution combined with Q-TOF LC/MS / Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-8077EN. 2016.



Рисунок 7. MC/MC-спектр, связанный с дважды заряженным MMAE-сопряженным пептидом SCDK при m/z 884,4811

ТОЧНО ИЗМЕРЯЕМАЯ МАССА И СПЕКТРАЛЬНАЯ ПОГРЕШНОСТЬ В ОДИНОЧНЫХ КВАДРУПОЛЬНЫХ СИСТЕМАХ AGILENT LC/MS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПО CERNO MASSWORKS

АВТОР

D. Kuehl,
PhD
Cerno Bioscience

ВВЕДЕНИЕ

Одиночные квадрупольные системы LC/MS (ЖХ/МС) интенсивно используются в аналитических лабораториях, тем не менее они не подходят для использования в сферах применения, в которых требуется идентификация неизвестных составных формул. На одной квадрупольной МС-системе, работающей при разрешении единицы массы, типичные характеристики производителя соответствует точности массы ~0,1–0,5 Da, что является недостаточным для точного определения элементного состава (ID формулы). Однако с использованием усовершенствованных методов калибровки, доступных в программном обеспечении Cerno MassWorks, одиночные квадрупольные системы LC/MS могут обеспечить 100-кратное увеличение точности по массе и, что более важно, точное моделирование изотопного профиля соединения до 99,0% спектральной точности [1]. Комбинация систем Agilent LC/MS и ПО MassWorks является экономически выгодным решением для определения ID формулы и однородных смесей. В данной статье оценивается производительность системы Agilent LC/MS с точки зрения достижимой точности массы и спектральной точности, которые позволяют определить неизвестный ID формулы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве калибровочного образца для теста производительности использовался стандартный образец Agilent (G2421-60001). Данный раствор содержит ряд калибровочных ионов со значениями массы от 117 до 2722 Da. Параметры одиночных квадрупольных систем Agilent 6120B LC/MS были настроены для получения данных в режиме без обработки с порогом нулевого иона. Диапазон сканирования инструмента был установлен на значении от 100 до 1000 Da в режиме сканирования в режиме полного хранения полученных данных [2]. В качестве образца для оценки эффективности был использован резерпин, который является общим эталонным стандартом для проведения испытаний, используемым в LC/MS, с молекулярной массой 608,68 и молекулярной формулой $C_{33}H_{40}N_2O_9$. Десять микролитров раствора и резерпина были введены в контур LC/MS. Концентрация резерпина составляла 100 ppm для общего объема введения в 1 мкг (аналогичный объем на колонке при ЖХ-анализе). Резерпин вводили 10 раз, для того чтобы получить более точную статистику.

Полученные при помощи эталонного раствора данные далее были использованы непосредственно в ПО MassWorks в режиме калибровки. Калибровочные ионы автоматически устанавливались путем простой загрузки предварительно заданного списка ионов для смеси Agilent. На рисунке 1 приведены некоторые скриншоты

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

программного обеспечения во время процесса калибровки. После анализа результатов файл калибровки был сохранен и применен ко всем прогонам образцов, производящим полностью откалиброванные спектры массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 2 приведены результаты поиска формулы в режиме анализа из калиброванных данных для одного из повторяемых измерений. Поиск проводился для обнаружения всех формул, содержащих C, H, N и O, в диапазоне допусков массы до 10 mDa (то есть измеренная масса после калибровки при помощи MassWorks с точностью до 0,00x Da), что дает 38 возможных комбинаций химических составов. Ввиду того, что весь профиль МС, включающий все основные и второстепенные изотопы, также был откалиброван до известной кривой, вычисление истинного спектра массы при помощи основных принципов для каждого возможного химического состава и вычисление соответствующей спектральной погрешности в сравнении с откалиброванным спектром масс было довольно простой задачей. Спектральная погрешность – это простая математическая метрика, которая определяет, насколько хорошо соответствует истинный и откалиброванный спектр масс. Далее кандидаты для поиска формулы могут быть отсортированы по спектральной погрешности, для того чтобы обеспечить чрезвычайно высокую достоверность результатов формулы. Например, на рисунке 2 изображена спектральная погрешность, которая составляет более 99,1% правильной формулы резерпина, при этом следующий лучший результат будет ниже

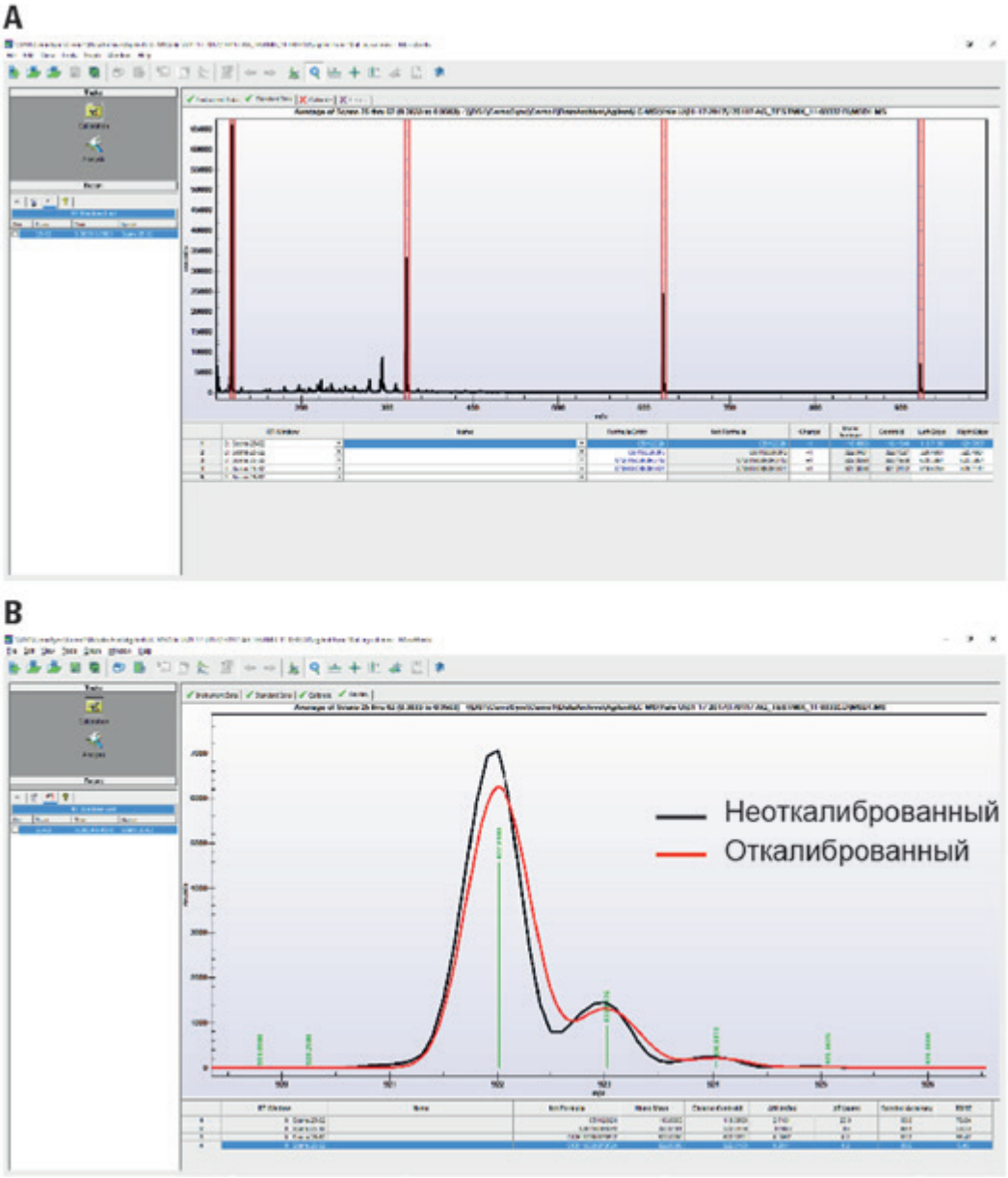


Рисунок 1. **На скриншотах изображен автоматический выбор калибровочных ионов (A) и описание откалиброванного и неоткалиброванного спектра массы (B)**

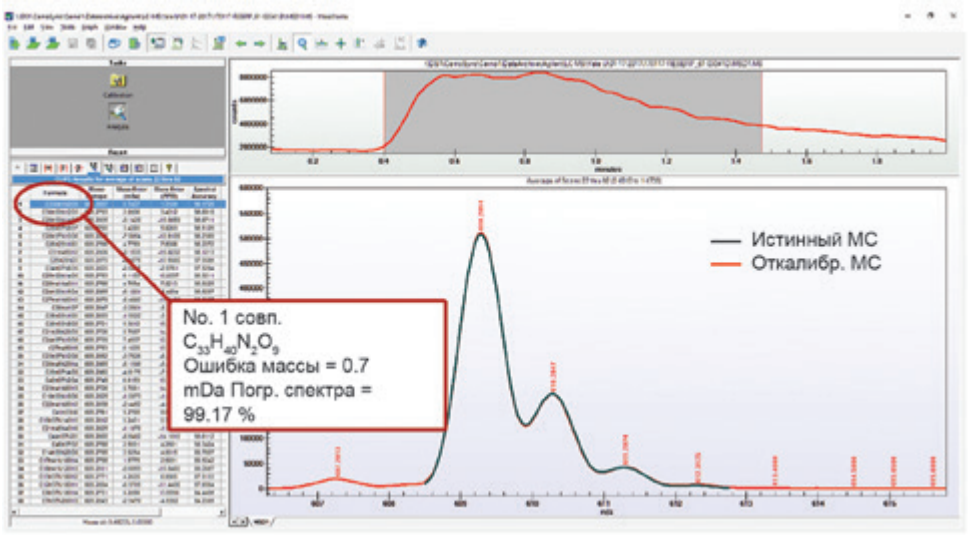


Рисунок 2. **Результат поиска формулы резерпина с совпадением № 1 match, ошибкой массы менее чем 1 mDa и с точностью спектра более чем 99%. На графике показано спектральное наложение истинного спектра масс (черный цвет) и откалиброванного спектра масс (красный цвет) и насколько точно они совпадают**

значения 98,7%. Данный усовершенствованный алгоритм идентификации формулы (поиск откалиброванной кривой профиля изотопа – CLIPS) сочетает в себе как точность массы, так и спектральную погрешность и позволяет идентифицировать формулу на стационарных системах LC/MS.

В таблице 1 приведена статистическая сводка 10 повторяемых измерений. Повторяемость измерений показывает, что допустимая ошибка массы находилась в пределах ±0,005 Da (5 mDa), что примерно в 100 раз лучше, чем спецификация неоткалиброванного прибора. Кроме того, откалиброванная кривая спектра массы обеспечивает дополнительную и более мощную метрику для идентификации формулы со спектральной погрешностью 99,0%. Доказанная стабильность работы семейства квадрупольных приборов Agilent позволяет выдерживать калибровку в течение многих дней [3], что, в свою очередь, позволяет избавиться от ненужных повторных калибровок и улучшает простоту использования программного обеспечения MassWorks для идентификации формулы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинация ПО MassWorks с одинарной квадрупольной системой Agilent LC/MS обеспечивает точность массы выше, чем 5 mDa, а также спектральную погрешность 99,0% в повторяемых измерениях резерпина. Новейшее ПО для калибровки и анализа МС позволяет преобразовать стационарную рабочую квадрупольную систему LC/MS в мощный и затратосберегающий инструмент для идентификации формул. Именно благодаря этому Вы можете сэкономить как время, так и деньги, получив больше возможностей по сравнению с более дорогостоящими специализированными инструментами высокого разрешения.

Таблица 1.

Статистическая сводка по ошибкам масс- и спектральной погрешности 10 последовательных вводов ризерпина

Ввод	Точность массы	Ош. массы (mDa)	Ош. массы (ppm)	Спектральная погрешность (%)
1	609,2781	–2,6	–4,2	99,06
2	609,2822	1,5	2,5	99,05
3	609,2824	1,7	2,9	99,01
4	609,2840	3,3	5,5	98,71
5	609,2781	0,4	0,7	98,98
6	609,2814	0,7	1,2	99,17
7	609,2802	–0,5	–0,8	98,82
8	609,2800	–0,7	–1,1	99,11
9	609,2781	–1,5	–2,4	98,82
10	609,2822	–0,2	–0,3	99,00
Средн	609,2807	0,3	0,4	98,97
Стан. откл	0,0021	1,7	2,8	0,15

Благодарность

Выражаем огромную благодарность господину Теренсу Ву, директору университета Yale University West Campus Core MS за его непосредственное участив в проведении испытаний, а также за возможность использования системы Agilent LC/MS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Y. Wang, M. Gu. The Concept of spectral accuracy for MS // Anal. Chem. 2010. № 82. P. 7055-7062.
2. For a detailed guide on setting up the instrument parameters for MassWorks. URL: http://cernobioscience.com/wp-content/uploads/2016/12/support_recommended_first_experiment_for_lc_and_gc_systems_v4.pdf (дата обращения 10.01.2018).
3. J. Mullis, F. Qiu, Y. Wang. The Robustness of Formula Determination on a Single Quadrupole GC/MS. ASMS. 2008.

ЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМАХ MAURICE, ICE3 И ICE280 ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА ГЕТЕРОГЕННОСТИ МОЛЕКУЛ ПО ЗАРЯДУ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

Материал предоставлен компанией Proteinsimple



ВВЕДЕНИЕ

Для определения гетерогенности зарядов определенных биофармацевтических препаратов используют проверенные прикладные методы, которые предлагает платформа iCE. Maurice® позволяет расширить возможности платформы iCE, поскольку имеет такие функции, как флюоресцентное и SDS-детектирование, что позволяет получать качественные данные наравне с системами iCE280™ и iCE3® . Maurice также упрощает рабочий процесс благодаря возможности использования предварительно упакованного картриджа. Таким образом, уменьшается время настройки аппарата и сводится в минимуму вероятность возникновения ошибок оператора.

Целью данной статьи является наглядная демонстрация эквивалентности данных, полученных с помощью приборов, работающих на платформе iCE. Был выполнен анализ нескольких молекул с помощью трех систем iCE. Эквивалентность данных при использовании систем iCE280 и iCE3 вместе с автосамплерами Alcott и PrinCE была рассмотрена ранее [1], поэтому основное внимание в данной статье мы уделим сравнению таких возможностей систем iCE280-PrinCE, iCE3-PrinCE и Maurice, как количественное определение и воспроизводимость в режиме записи спектров поглощения.

MAURICE – УПРОЩЕНИЕ ПРОЦЕССА КИЭФ

Maurice существенно упрощает процесс проведения анализа гетерогенности заряда, так как все механические соединения, которые нужно производить вручную в системах iCE280 и iCE3, заменяет готовый к использованию картридж КИЭФ. Для дополнительного удобства использования Maurice оснащен встроенным автосамплером.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Maurice не требует выполнения лишних манипуляций в ходе подготовки к работе, поскольку у прибора нет линии перетока и капилляра, не нужно переключать клапаны и выполнять утомительную процедуру установки картриджей. Перед началом работы достаточно просто загрузить образцы и реагенты в Maurice, установить необходимые параметры работы и нажать кнопку **Start** (пуск) – и все готово. По окончании процесса Maurice очищает картридж КИЭФ в автоматическом режиме. Все, что остается сделать оператору, это ополоснуть емкости картриджа, в которых содержался электролит, убрать остатки образцов и реагентов, и можно приступать к следующему анализу.

ПРОСТОЙ ТРАНСФЕР МЕТОДИК МЕЖДУ РАЗНЫМИ ПРИБОРАМИ

Трансфер методик между системами iCE280, iCE3 и Maurice не вызывает проблем, поскольку процедура пробоподготовки и функциональность систем являются идентичными. В системах Maurice используются определенные pI-стандарты, которые были оптимизированы как для определения поглощения, так и собственной флуоресценции. В данном исследовании применялись только pI-стандарты iCE, поскольку целью исследования является сравнение поглощения. Подготовка проб для каждой тестируемой молекулы проводилась одинаково для всех трех используемых систем.

Для сравнения эквивалентности данных был выполнен анализ трех разных молекул в системах iCE280, iCE3 и Maurice в режиме измерения поглощения по методу КИЭФ. Ввод пробы осуществлялся одним и тем же оператором в течение 3 дней анализа, всего было выполнено 36 анализов каждой молекулы. Подготовка образцов для анализа осуществлялась ежедневно. Полученные данные обрабатывали с использованием программы ChromPerfect (v6.0.4), с помощью которой определяли значение pI и процентное соотношение площадей пиков. Для анализа каждой молекулы применялся один и тот же метод, вследствие чего данные, полученные в каждой из трех систем, отличались целостностью и эквивалентностью.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА (EPO)

Ресуспендирование лиофилизованного эритропоэтина (EPO)

Также все три системы применялись для анализа эритропоэтина, терапевтического белка с кислой реакцией. Лиофилизованный эритропоэтин для проведения физико-химических испытаний был приобретен в Европейском директорате по качеству лекарств и здравоохранения (EDQM, PN Y0001725, партия 1). В каждом флаконе содержалось примерно 0,1 мг лиофилизованного материала, который был ресуспендирован путем добавления 200 мкл деионизированной воды на дно флакона при комнатной температуре. Смесь встряхивали в течение минимум 30 секунд до полного растворения твердой фазы.

Затем эритропоэтин был обессолен и сконцентрирован в центрифужной колонке Vivaspin 500 (Vivaspin, PN VS0101). Колонки центрифугировали при 10000 об/мин в течение 6 мин или до тех пор, пока в концентраторе не осталось примерно 25 мкл материала. Затем образцы либо смешивали со смесью мастер-микс, либо хранили при температуре 4 °C.

Пробоподготовка

Разведенный образец смешивали с cIEF мастер-микс таким образом, чтобы содержание мочевины составляло 4M, метилцеллюлозы – 0,35% , Pharmalyte 2.5-5 – 3,5%, Servalyt 3-5 – 0,5% и pI-маркеры – 3.59 и 5.85. Полученную смесь помещали в пробирку для центрифугирования на 1,5 мл до получения финального объема 200 мкл для анализа с помощью Maurice и 400 мкл для систем iCE3/iCE280. Далее полученную смесь перемешивали встряхиванием в течение 10 с, а затем центрифугировали в течение 3 мин со скоростью 10000 об/мин для осаждения нерастворимых частиц. Аккуратно, не касаясь дна пробирки для центрифугирования, отбирали 150 мкл и 330 мкл образца для анализа с помощью Maurice и iCE соответственно. Предварительная фокусировка образцов проводилась на всех трех системах в течение 1 мин при напряжении 1500 В с последующим разделением при 3000 В в течение 6 мин.

Эквивалентность данных для EPO

На системах iCE280, iCE3 и Maurice были получены согласующиеся друг с другом профили EPO, на которых было восемь пиков (рисунок 1, верхяя диаграмма). Профиль EPO содержал четыре основных пика и три второстепенных пика, высота самого большого пика составила около 0,06 единиц поглощения. Профили также были эквивалентны данным CZE, предоставленным Европейским директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM) (рисунок 1, нижняя диаграмма), что свидетельствует о достоверности данных, полученных с использованием платформы iCE.

Значения pI по всем системам находились в пределах 0,1 pI-единиц и соответствовали значению CVs ≤0,1% (таблица 1). Процентное соотношение площадей пиков в разных системах также были аналогичны. Разница значений составляла ≤2,1% для пиков площадью более 2%, и для пиков площадью более 10% CVs≤11,5% (таблица 2) .

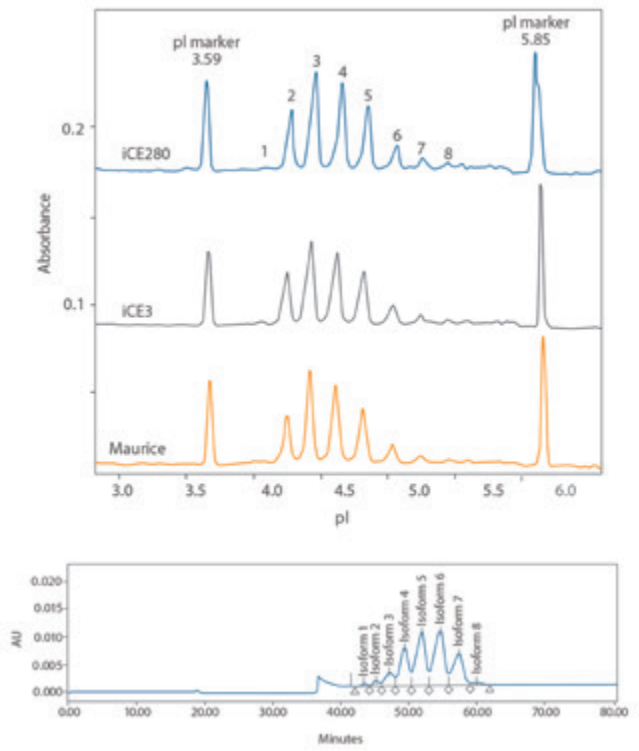


Рисунок 1. Профили EPO, полученные с использованием систем iCE280, iCE3 и Maurice (вверху). Профили сопоставимы с контрольными данными, полученными при использовании метода капиллярного зонального электрофореза (CZE). Данные были предоставлены Европейским директоратом по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM) (внизу)

Таблица 1.

Значения pI для EPO во всех трех системах iCE, в скобках указан % CVs

Среднее значение pI, (n=36)			
Пик	**iCE280 (% CV)**	**iCE3 (% CV)**	**Maurice (% CV)**
1	4,0 (1,1%)	4,0 (0,7%)	3,9 (0,3%)
2	4,1 (0,9%)	4,1 (0,8%)	4,1 (0,9%)
3	4,3 (0,9%)	4,3 (0,8%)	4,3 (1,1%)
4	4,5 (0,9%)	4,5 (0,8%)	4,5 (1,1%)
5	4,7 (0,9%)	4,7 (0,7%)	4,7 (1,0%)
6	4,9 (0,8%)	4,9 (0,6%)	4,9 (0,8%)
7	5,0 (0,8%)	5,0 (0,4%)	5,0 (0,8%)
8	5,2 (0,6%)	5,2 (0,3%)	5,2 (0,2%)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА 11 (mAB11)

Пробоподготовка

Системы Maurice, iCE3 и iCE280 использовались для проведения серии анализов моноклонального антитела (mAb11). При подготовке пробы 10 мг/мл белкового материала разбавляли мастер-микс для КИЭФ. Конечные концентрации компонентов были следующими: 0,35% метилцеллюлозы, 4% фармалита с pH 3-10 и pI-маркеры 5.85 и 8.40. Образцы перемешивали встряхиванием в течение 10 с, а затем центрифугировали в течение 3 мин при 10000 об/мин. Образец отбирали для последующего анализа с помощью Maurice (150 мкл) и iCE (330 мкл), стараясь не касаться дна пробирки для центрифугирования. Предварительная фокусировка образцов проводилась на всех трех системах в течение 1 мин при напряжении 1500 В с последующим разделением при 3000 В в течение 6 мин.

Таблица 2.

Среднее процентное соотношение площадей пиков EPO во всех трех системах iCE, в скобках указан CVs, %

Среднее соотношение площадей пиков, % (n=36)			
Пик	**iCE280 (% CV)**	**iCE3 (% CV)**	**Maurice (% CV)**
1	1,2 (17,4%)	1,4 (22,0%)	1,2 (19,2%)
2	15,7 (2,1%)	15,9 (1,7%)	15,7 (2,9%)
3	26,4 (2,0%)	26,8 (1,3%)	26,9 (1,6%)
4	25,8 (2,1%)	25,9 (1,6%)	26,2 (1,6%)
5	18,4 (2,9%)	18,5 (1,4%)	18,5 (1,5%)
6	6,9 (6,2%)	7,0 (6,2%)	6,8 (3,5%)
7	4,0 (11,9%)	3,3 (16,0%)	3,2 (6,9%)
8	1,6 (25,7%)	1,2 (20,6%)	1,4 (13,1%)

Эквивалентность данных mAB11

Данные, полученные в ходе анализов, были эквивалентны во всех трех системах. Было определено 6 пиков с основным пиком при pI=7.2 величиной около 0.15 единиц поглощения (рисунок 2). Полученные на разных приборах значения pI были полностью эк-

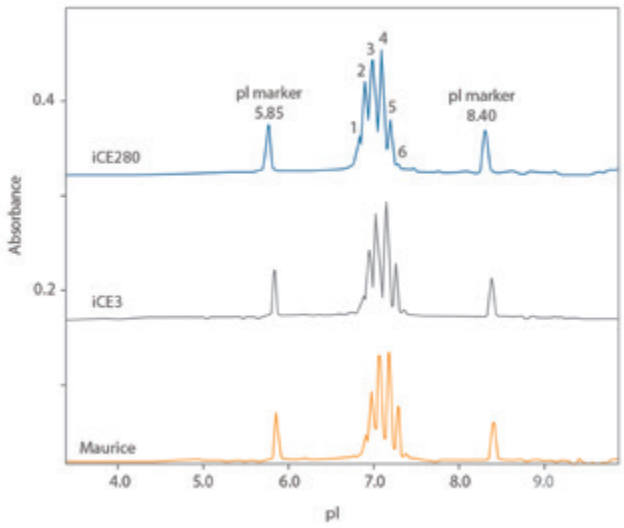


Рисунок 2. Эквивалентные профили mAb11, полученные на системах iCE280, iCE3 и Maurice

вивалентны (таблица 3). CVs для всех систем составлял ≤0.2%. Соотношение площадей даже небольших второстепенных пиков было в пределах 2%. Была продемонстрирована эквивалентность аналитических данных, собранных со всех использовавшихся систем (таблица 4). Системы iCE280, iCE3 и Maurice в режиме с методикой КИЭФ демонстрировали хорошую прецизионность при 11,5% для пиков с соотношением площадей более 10%. Данные, полученные с помощью прибора Maurice, отличались высокой прецизионностью при значениях ≤2,4% для пиков с соотношением площадей более 10%.

Таблица 3.

pI-значения mAb11 для всех трех систем iCE, в скобках указан CVs, %

Среднее значение pI (n=36)			
Пик	**iCe280 (% CV)**	**iCe3 (% CV)**	**MAuriCe (% CV)**
1	6,9 (0,1%)	6,9 (0,1%)	6,9 (0,0%)
2	7,0 (0,1%)	7,0 (0,1%)	7,0 (0,0%)
3	7,1 (0,2%)	7,1 (0,1%)	7,1 (0,1%)
4	7,2 (0,1%)	7,2 (0,1%)	7,2 (0,0%)
5	7,3 (0,1%)	7,3 (0,0%)	7,3 (0,0%)
6	7,4 (0,2%)	7,4 (0,1%)	7,4 (0,0%)

Таблица 4.

Среднее процентное соотношение площадей пиков mAb11 во всех трех системах iCE, в скобках указан CVs, %

Среднее соотношение площадей пиков, % (n=36)			
Пик	**iCE280 (% CV)**	**iCE3 (% CV)**	**Maurice (% CV)**
1	7,8% (14,5%)	6,2% (11,8%)	7,1% (9,0%)
2	20,5% (11,5%)	18,5% (4,0%)	18,4% (2,4%)
3	32,1% (6,0%)	32,7% (2,2%)	32,5% (1,4%)
4	28,2% (3,4%)	30,0% (1,9%)	29,5% (1,0%)
5	10,4% (7,1%)	11,5% (3,2%)	11,2% (1,3%)
6	1,0% (18,5%)	1,1% (10,0%)	1,3% (7,5%)

АНАЛИЗ НА СОДЕРЖАНИЕ АНТИ-α1-АНТИТРИПСИНА

Пробоподготовка

Системы Maurice, iCE3 и iCE280 использовались для анализа анти-α1-антитрипсина. 5,87 мг/мл матричного раствора анти-α1-антитрипсина (EMD Calbiochem, PN 178260, LN 2638191) разбавляли с использованием мастер-микс КИЭФ. Готовый образец содержал следующую конечную концентрацию компонентов: 0,35% метилцеллюлозы, 4 М мочевину, 3% фармалит pH 5-8, 1% фармалит pH 3-10 и pI-маркеры 5.85 и 8.40. Образцы перемешивали встряхиванием в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 3 минут со скоростью 10000 об/мин. 150 мкл или 330 мкл образца аккуратно отбирали для дальнейшего анализа с помощью Maurice и iCE соответственно.

Предварительная фокусировка образцов проводилась на всех трех системах в течение 1 минуты при напряжении 1500 В с последующим разделением при 3000 В в течение 12 мин.

Эквивалентность данных для анти-α1-антитрипсина

С помощью систем iCE280, iCE3 и Maurice были получены эквивалентные профили анти-α1-антитрипсина, которые содержали семь хорошо различимых пиков и почти незаметный восьмой пик со значением pI около 7,2 (рисунок 3). Размер основного пика (пик 5) на всех трех системах составил больше 0,05 единиц поглощения.

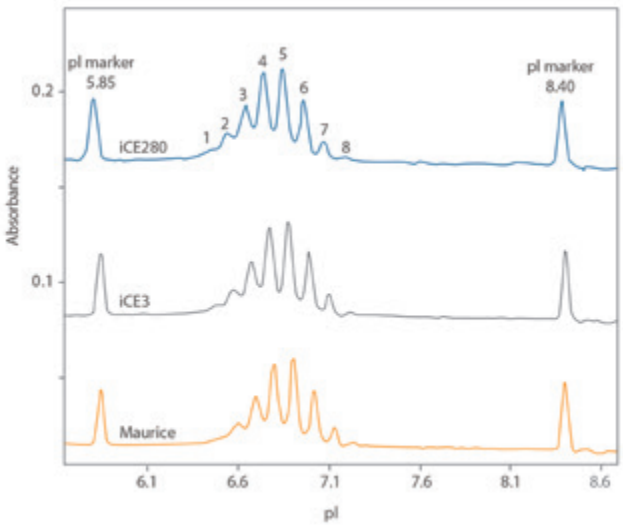


Рисунок 3. Эквивалентные профили анализа анти-α1-антитрипсина, полученные на приборах iCE280, iCE3 и Maurice

Полученные на всех трех приборах данные отличались хорошей сходимостью. Зарегистрированные значения pI были одинаковыми и соответствовали CV ≤0,4% (таблица 5). Процентные соотношения площадей пиков во всех системах также были эквивалентны. Разница в значениях составила ≤0,4% для пиков с соотношением площадей 2% и незначительно отличалась для всех основных пиков с соотношением площадей ≥10% (таблица 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе экспериментов данные анализов гетерогенности молекул по заряду с использованием приборов iCE3 и iCE280 демонстрируют хорошую воспроизводимость, необходимую для быстрого вывода нового препарата на рынок. Прибор Maurice по-

зволяет не только получить воспроизводимые данные, но и крайне прост в использовании. Система сводит к минимуму время, требуемое на подготовку к анализу, а также минимизирует вероятность ошибок, совершаемых оператором.

Таблица 5.

pI-значения анти-α1-антитрипсина для всех трех систем iCE, процентный объем колонок указан в скобках

Среднее значение pI (n=36)			
Пик	**iCE280 (% CV)**	**iCE3 (% CV)**	**Maurice (% CV)**
1	6,5 (0,2%)	6,5 (0,1%)	6,5 (0,2%)
2	6,6 (0,2%)	6,6 (0,1%)	6,6 (0,1%)
3	6,7 (0,2%)	6,7 (0,1%)	6,7 (0,2%)
4	6,8 (0,2%)	6,8 (0,1%)	6,8 (0,2%)
5	6,9 (0,2%)	6,9 (0,1%)	6,9 (0,2%)
6	7,0 (0,2%)	7,0 (0,1%)	7,0 (0,2%)
7	7,1 (0,3%)	7,1 (0,1%)	7,1 (0,3%)
8	7,2 (0,3%)	7,2 (0,1%)	7,2 (0,3%)

Таблица 6.

pI-значения анти-α1-антитрипсина для всех трех систем iCE, CVs (%) указан в скобках

Среднее соотношение площадей пиков, % (n=36)			
Пик	**iCE280 (% CV)**	**iCE3 (% CV)**	**Maurice (% CV)**
1	3,0% (25,8%)	3,3% (10,1%)	3,2% (13,0%)
2	8,4% (9,3%)	8,8% (3,8%)	8,8% (6,9%)
3	17,4% (2,6%)	17,0% (4,3%)	17,4% (2,2%)
4	25,5% (2,2%)	25,6% (2,2%)	25,3% (1,6%)
5	25,1% (2,7%)	25,0% (1,8%)	24,9% (1,9%)
6	14,8% (2,3%)	14,7% (2,2%)	14,8% (1,9%)
7	4,8% (4,5%)	4,7% (3,7%)	4,6% (8,1%)
8	1,0% (20,9%)	0,9% (10,5%)	1,0% (14,1%)

При сравнении результатов КИЭФ анализов mAb11, эритропоэтина (EPO) и анти-α1-антитрипсина, полученных с использованием системы Maurice в режиме измерения поглощения, а также систем iCE280 и iCE3 было обнаружено, что результаты являются сравнимыми. Значения pI во всех системах находились в пределах 0,1 pI-единиц при CVs ≤0,4%. Наибольшая сходимость результатов наблюдалась при соотношении площадей пиков >2%. На примере полученных повторно данных также была продемонстрирована надежность приборов на платформе iCE. Для каждой серии проб было выполнено по шесть повторных исследований в течение трех разных дней. Подготовка проб осуществлялась каждый день. В общей сложности было сделано 36 анализов, и для всех пиков с соотношением площадей более 10% CVs≤11, 5%. Среднее значение CV по всем пикам с соотношением площадей более 10% для всех трех молекул во всех системах составило 2,4%.

Из этого следует, что при проведении анализа гетерогенности молекул по заряду методом КИЭФ в режиме измерения поглощения применение систем iCE280, iCE3 или Maurice позволяет получить эквивалентные данные независимо от того, какой из приборов использован. При необходимости можно легко осуществлять трансфер методик между данными приборами.

ЛИТЕРАТУРА

1. iCE3 and iCE280 Analyzer System Performance Comparison, ProteinSimple Application Note.
2. Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: An interlaboratory study, O Salas-Solano, B Kennel, SS Park, K Roby, Z Sosic, B Boumajny, S Free, A Reed-Bogan, D Michels, W McElroy, P Bonasia, M Hong, X He, M Ruesch, F Moffatt, S Kiessig, B Nunnally, J. Sep. Sci. 2012; 35(22): 2124-2129.

ЦЕНТРОБЕЖНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ И РАЗДЕЛЕНИЕ

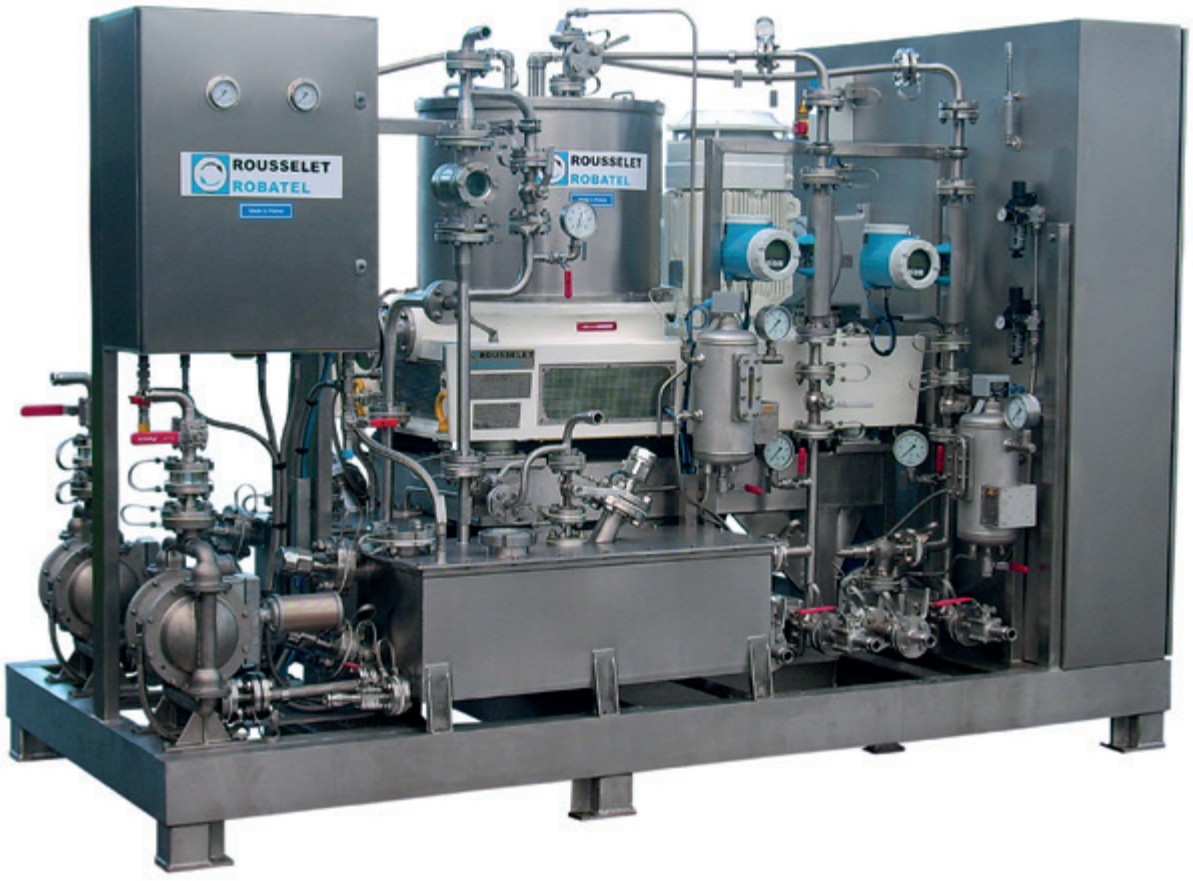
Материал предоставлен компанией Rousselet Robatel

ВВЕДЕНИЕ

Экстракция «жидкость–жидкость», также называемая экстракция растворителя, позволяет разделить два или более соединений благодаря их разной растворимости в двух несмешиваемых фазах (тяжелая и легкая фаза).

На практике применение процесса экстракции «жидкость–жидкость» предполагает две следующие операции:

- тщательный контакт двух жидкостей на протяжении времени, достаточного для достижения равновесия, в течение которого растворенное вещество (вещества) переносятся из исходной фазы в растворитель;
- последующее разделение двух жидкостей (на экстракт и рафинат).



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Основными преимуществами технологии центробежной экстракции по сравнению с другими технологиями являются:

- ✓ низкий коэффициент удерживания по сравнению с расходом;
- ✓ быстрое достижение равновесия фаз и его стабильность;
- ✓ короткое время контакта, снижающее риски деградации продукта;
- ✓ возможность работать с жидкостями, близкими по плотности;
- ✓ отсутствие необходимости создавать давление на входе, процесс разделения не требует повышенного давления.

Экстракторы Rousselet Robatel являются многоступенчатыми. На каждой ступени две фазы смешивают и затем разделяют, что обеспечивает идеальный массообмен и разделение. С точки зрения эффективности одна механическая ступень = одна теоретическая ступень.

Экстракция широко применяется в химической, нефтеперерабатывающей, металлургической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности, например для извлечения ароматических углеводородов из нефтепродуктов, масляных фракций из сернистой нефти, фенола из сточных вод, антибиотиков из культуральных жидкостей, металлов (в т. ч. редких) или их соединений из руд, многих природных органических соединений из растительного сырья (сахара из свёклы и тростника, масла из соевых бобов и масличных семян, танина из древесной коры, фармацевтических препаратов из корней и листьев растений и т. п.).

ЖИДКОСТНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ

Процесс разделения жидких веществ также известен как растворительная экстракция. Этот процесс позволяет осуществлять разделение двух- или многокомпонентных смесей при разной их растворимости в двух несмешиваемых жидких фазах.

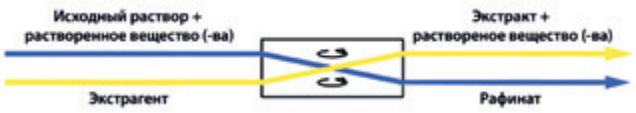


Рисунок 1. Процесс жидкостной экстракции

При применении центробежного экстрактора для жидкостной экстракции исходный раствор может содержать два или более веществ, а также растворитель, который по плотности отличается от исходного раствора. Раствор совместно с растворителем подается в камеру смешения для получения дисперсного раствора. Эффективное смешение создает большую межфазовую область между двумя жидкостями, что, в свою очередь, обеспечивает максимальный массообмен между растворами.

Полученный дисперсный раствор далее разделяется путем осаждения (технология смесителей-отстойников) или центрифугирования (центробежные экстракторы BXP или LX) в зависимости от вида выбранного экстрактора. Смешение и разделение представляет собой одну фазу экстракции.

Растворитель подбирается отдельно в каждом процессе в зависимости от компонентов раствора. В зависимости от выбранного растворителя и его количества, необходимого для качественного массообмена, часто возникает необходимость проводить несколько этапов экстракции для достижения желаемых результатов обработки. В этом случае наиболее эффективным методом является противоточная экстракция.

На рисунках 2 и 3 приведено сравнение двух типов экстракции: поперечноточная экстракция (рисунок 2) и противоточная экстракция (рисунок 3).

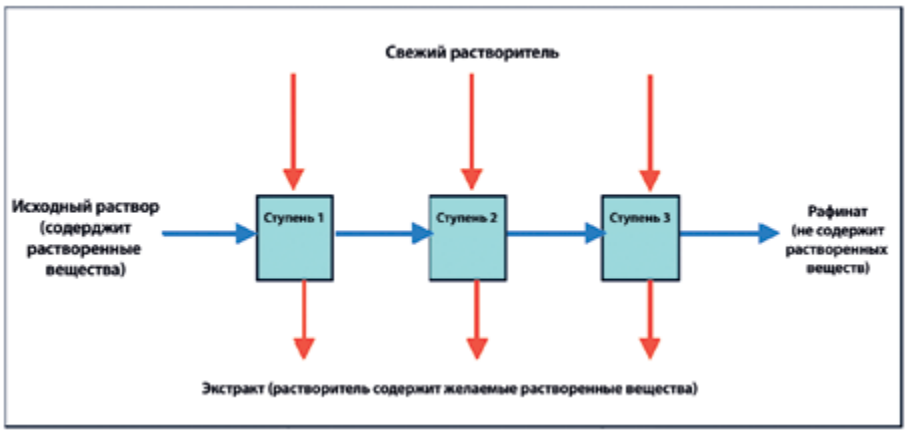


Рисунок 2. Поперечноточная экстракция

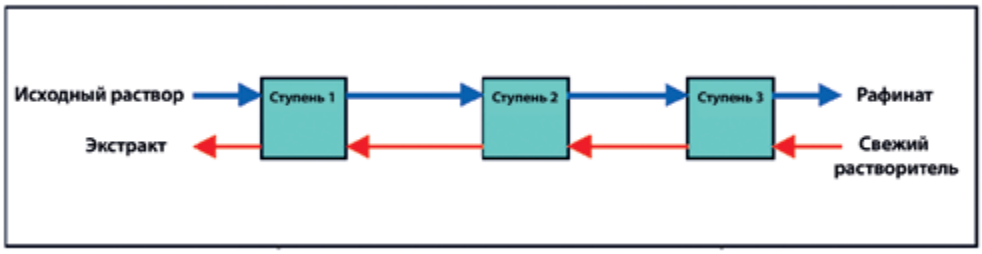


Рисунок 3. **Противоточная экстракция**

Минусы применения поперечноточной экстракции:

- длительный процесс;
- большое потребление растворителя.

В качестве примера рассмотрим **моноступенчатые центробежные экстракторы типа BXP Rousselet Robatel,** которые могут быть использованы для жидкостной экстракции (конфигурация «экстрактор») или для жидкостной сепарации (конфигурация «сепаратор»).

Рассмотрим подробнее данную модель экстракторов в каждой из двух конфигураций.

В случае жидкостной экстракции исходный раствор содержит два вещества или более (на рисунке показаны желтым цветом) и несмешиваемый растворитель (на рисунке показан фиолетовым цветом), отличающийся по плотности от исходного раствора. Растворы подаются в камеру смешения, расположенную в низу корпуса.

Смешение двух растворов производится с помощью вращающегося смесительного диска с образованием дисперсии (на рисунке указано зеленым цветом). В зависимости от значения поверхностного натяжения жидкости применяются разные типы дисков-смесителей. Эффективное смешение создает большую межфазовую область между двумя жидкостями, что, в свою очередь, обеспечивает максимальный массообмен между растворами.

Дисперсный раствор подается в ротор при помощи турбины, которая расположена в низу ротора. Жидкости разделяются под действием центробежной силы, создаваемой вращающимся ротором. Тяжелая фаза (желтая на рисунке) занимает внешнюю часть ротора, легкая фаза (фиолетовая на рисунке) – внутреннюю. Расположение интерфазы «жидкость/жидкость» зависит от положения вывода твердой фазы.

Заменяемые выводы тяжелой фазы разных диаметров подходят для растворов с разным соотношением плотностей. Тяжелая фаза поступает в статическую приемную часть экстрактора. Легкая фаза поступает в отдельную статическую приемную часть.

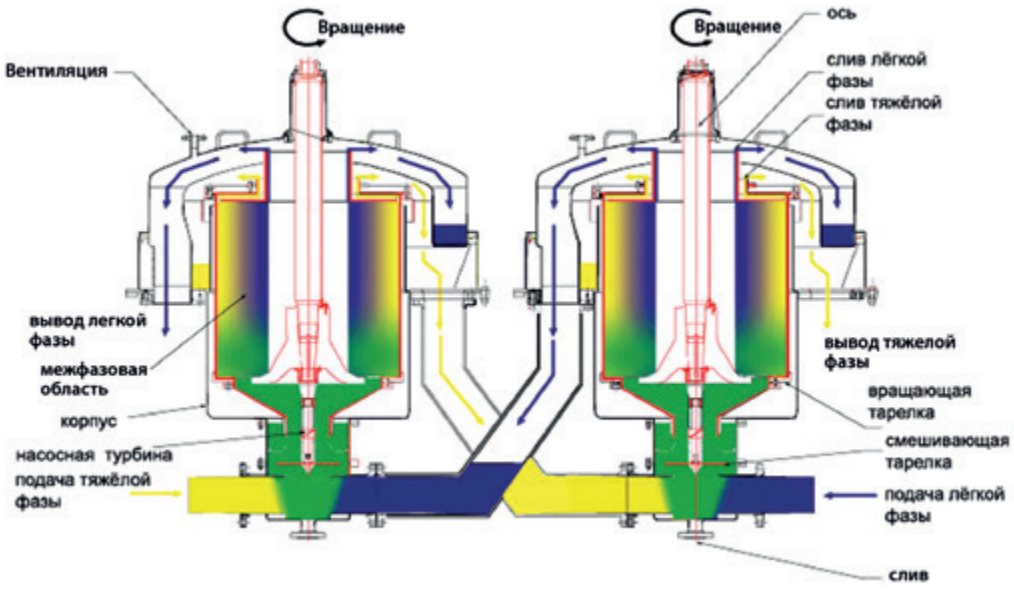


Рисунок 4. **Схема экстракции**

Для многоступенчатой экстракции возможна установка нескольких центробежных экстракторов BXP с целью получения необходимого количества стадий смешения и экстракции. Между отдельными стадиями экстракции нет необходимости устанавливать насосы.

Внешняя обвязка системы позволяет подавать или удалять жидкости в ходе процесса экстракции (основная экстракция, очистка, повторная экстракция) для максимальной оптимизации процесса.

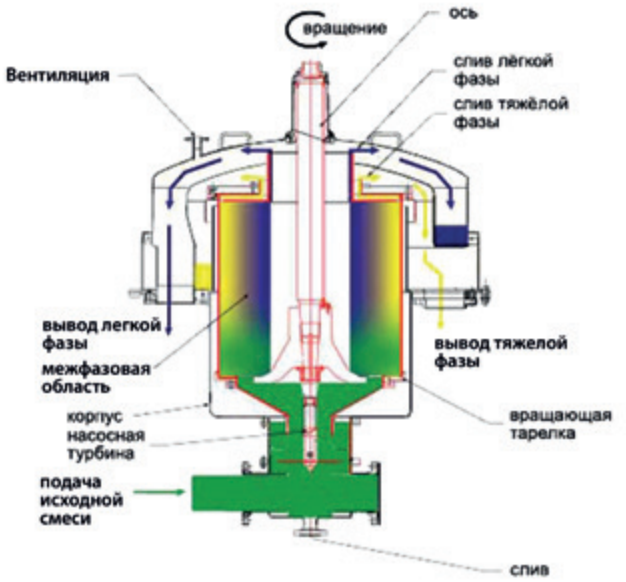


Рисунок. 5. **Схема сепарации**

В случае центробежной сепарации смесь из двух несмешиваемых жидкостей (на рисунке указано зеленым цветом) с разными плотностями подается в насосную камеру, которая находится в низу корпуса.

Смесь «жидкость/жидкость» подается в ротор насосной турбиной, которая расположена в нижней части ротора. Разделение жидкостей происходит под действием центробежной силы, создаваемой вращающимся ротором. Тяжелая фаза (желтая на рисунке) занимает внешнюю часть ротора, легкая фаза (фиолетовая на рисунке) – внутреннюю.

Расположение интерфазы зависит от положения вывода тяжелой фазы. Заменяемые выводы тяжелой фазы разных диаметров подходят для растворов с разным соотношением плотностей. Тяжелая фаза поступает в статическую приемную часть, сепаратора. Легкая – в отдельную статическую приемную часть корпуса.

Подача жидкостей на следующую ступень осуществляется самотеком.

Главные технические характеристики центробежных экстракторов и сепараторов BXP.

- ✓ Мотор напрямую соединен с основным валом.
- ✓ Отсутствие донных подшипников в зоне процесса.
- ✓ Уникальная полностью полимерная конструкция обладает коррозионной устойчивостью.
- ✓ Опционально возможно применение CIP для GMP.
- ✓ При необходимости возможно фармацевтическое исполнение оборудования.
- ✓ Может применяться как для периодических, так и для непрерывных процессов.
- ✓ Короткое время удерживания и малые потери жидкости.
- ✓ Эффективное разделение фаз под действием центробежной силы.
- ✓ Различный дизайн мешалки для оптимальной работы с различными типами растворителей.
- ✓ Для деликатного смешения возможно осуществлять процесс на низких оборотах.
- ✓ Отсутствие необходимости мониторинга процесса.
- ✓ Высокая пропускная способность при компактных размерах оборудования.



- ✓ Высокая эффективность экстракции благодаря тщательному смешению.
- ✓ Каждый экстрактор соответствует определенной стадии теоретической экстракции.
- ✓ Быстрое операционное равновесие.
- ✓ Внутренняя рециркуляция тяжелой или легкой фазы.
- ✓ Возможность применения в качестве как жидкостного экстрактора, так и жидкостного сепаратора.
- ✓ Возможность объединять несколько BXP в серию (не требуются дополнительные насосы) для получения необходимого количества стадий.

МНОГОСТУПЕНЧАТЫЕ ЦЕНТРОБЕЖНЫЕ ЭКСТРАКТОРЫ ТИПА LX

Центробежные экстракторы типа LX, так же как и экстракторы BXP, могут быть использованы как для жидкостной экстракции, так и для жидкостной сепарации.

Принцип действия

Исходный раствор содержит одно или более растворенных веществ (тяжелая фаза) и несмешиваемый экстрагент, отличающийся по плотности (лёгкая фаза), которые подаются противоточно через ротор экстрактора, представляющий серию механических секций, обеспечивающих необходимое количество ступеней экстракции.

Последующие операции смешения и разделения на каждой из механических ступеней обеспечивают массообмен растворимых веществ из исходного раствора в экстрагент.

Каждая ступень состоит из:

- ✓ камеры смешения, где обе фазы смешиваются и происходит обмен растворов экстракции. Фиксированный диск смешивает две фазы, и они образуют эмульсию. Он работает как насос, перекачивая жидкости из предыдущей ступени;
- ✓ в камере декантации, где предварительно смешанные растворы разделяются под действием центробежной силы. Межфазное положение зависит от диаметра вывода тяжёлой фазы, который является заменяемым и подбирается, исходя из соотношения плотности фаз.

Обе фазы подаются в экстрактор через трубки подачи, размещенные в верхней части корпуса. В моделях LX 320/360/520/570 тяжёлая фаза подается в верхнюю ступень, а лёгкая – в нижнюю, в моделях LX 120/200 при противоточной экстракции – наоборот.

В зависимости от модели перемещение разделяемых фаз осуществляется под действием либо силы тяжести, либо центробежной силы.

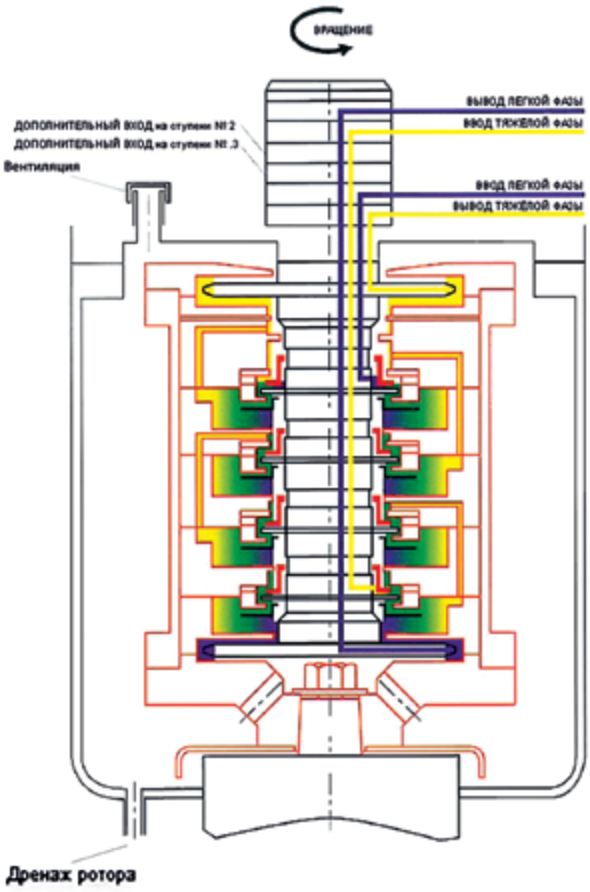


Рисунок 6. Схема многоступенчатого центробежного экстракта

Основные преимущества центробежных экстракторов и сепараторов LX.

- ✓ возможность установки до 7 ступеней на одной машине, что обеспечивает непревзойдённое качество экстракции;
- ✓ каждая механическая ступень полностью отвечает теоретическому расчёту экстракции;
- ✓ компактная установка с малой занимаемой площадью;
- ✓ экстрактор можно помещать на мобильную тележку для более легкого перемещения;
- ✓ низкие расходы на эксплуатацию и обслуживание (1 ротор/1 мотор);
- ✓ центростремительные турбины для перемещения под давлением жидкости в накопительные емкости или на следующий технологический этап

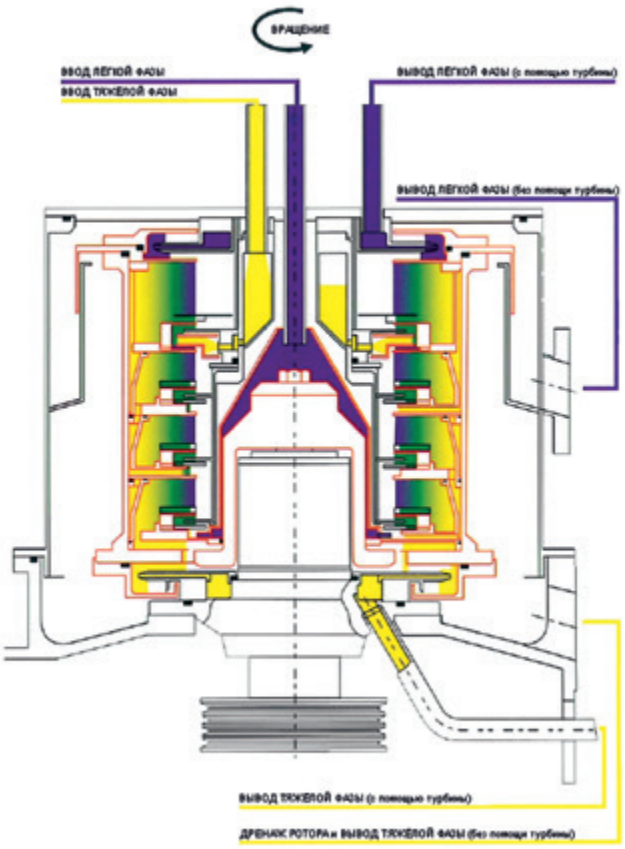


Рисунок 7. **Поперечный чертеж 4-ступенчатого центробежного экстрактора LX 320, LX 360, LX 520, LX 570**

(или во входной трубопровод следующего экстрактора, если предусмотрены несколько ступеней экстракции).

Некоторые модели разработаны с возможностью подачи жидкости на каждой промежуточной ступени для осуществления фракционированной экстракции или при необходимости применения третьей фазы (регулирование pH, промывка фазы перед ее отводом, ввод третьей жидкости, смешиваемой с какой-либо из двух фаз).

В случае если процесс экстракции является двухступенчатым, то оставшиеся ступени можно использовать для улучшения чистоты фаз и уменьшения объёма фазы, уносимой другой фазой.

Основные области применения центробежных экстракторов:

- фармацевтическая промышленность, в частности для очищения АФИ (например, антибиотики);
- химическая промышленность: для осуществления процессов промывки (например, полимеры) или экстракции (например, уксусная кислота);
- пищевая промышленность: прежде всего очищение пищевых добавок (например, при производстве молочной или лимонной кислоты);
- гидрометаллургия: для процессов разделения или очистки (ценные металлы);
- другие отрасли, такие как парфюмерная, производство эфирных масел.

Основные преимущества центробежных экстракторов ROUSSELET ROBATEL

- ✓ Подходят как для непрерывного цикла работы, так и для периодического.
- ✓ Короткое время удерживания и низкая потеря жидкости.
- ✓ Эффективное разделение фаз с помощью центробежной силы.
- ✓ Не требует непрерывного контроля.
- ✓ Высокая эффективность экстракции благодаря тщательному смешиванию.
- ✓ Быстрое достижение равновесия процесса.

СТАНДАРТЫ КАЧЕСТВА

Экстракторы соответствуют европейским стандартам и директивам качества (ATEX для соответствующих стран), а также имеют полный комплект технической документации (сертификаты на материалы, сварочные швы, протоколы тестов и проверки сварки, балансировки ротора, протоколы обработки деталей, сертификаты соответствия, схемы и чертежи, руководство пользователя, список рекомендуемых запчастей и др.).



ВЫСОКАЯ ТОЧНОСТЬ И ПРЕЦИЗИОННОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ С ВИБРАЦИОННЫМИ СИТАМИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Материал предоставлен компанией Vibrowest

ВВЕДЕНИЕ

Компания Vibrowest занимается постоянной модернизацией всего ассортимента своего просеивающего и фильтрующего оборудования, а также уделяет особое внимание совершенствованию производственно-технологического процесса с целью удовлетворения самых строгих требований, предъявляемых фармацевтической промышленностью. На протяжении более 50 лет специалисты компании проводят обширные маркетинговые исследования, сотрудничая с крупнейшими мировыми производителями фармацевтической продукции. Компания Vibrowest в своей деятельности стремится соответствовать высоким критериям, регламентирующим вопросы дизайна, удобства использования и результатов деятельности.

Все оборудование для фармацевтического применения производится с использованием высококачественной нержавеющей стали марки 316L, а поверхности деталей, контактирующих с продуктами, имеют шероховатость поверхности Ra 0,1. Наряду с высоким качеством оборудования производитель позаботился и об удобстве эксплуатации в условиях GMP-производств: все сборные части легко и быстро разбираются с целью последующей мойки и обслуживания.



ВИБРАЦИОННЫЕ СИТА ВЫСОКОГО КАЧЕСТВА

Вибрационное сито или просеивающая установка – это неотъемлемая часть любого процесса производства фармацевтической продукции, так как качество, сохранность структуры и чистота продукта имеют особое значение.

Вспомогательные вещества – лактоза, крахмал и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – постоянно применяются в твердых дозированных лекарственных формах, предназначенных для приема внутрь, таких как таблетки, капсулы или порошки в пакетиках саше. Использование оборудования Vibrowest для просеивания наполнителей гарантирует получение продукта высокого качества, надежно удаляя любые посторонние включения, размер которых превышает размер пор сита. Это могут быть части упаковки, материалов машин и механизмов, попадающих в продукт вследствие их износа, или нежелательные частицы, которые естественным образом содержатся в наполнителе.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Основные преимущества оборудования для фармацевтического применения:

- легкость очистки вибросита в промежутках между работой с различными партиями без необходимости использования инструментов;
- низкий уровень шума и низкие эксплуатационные расходы;
- наличие пакетов документации по аттестации установленного оборудования (IQ, OQ и PQ);

ВИБРОСИТА ДЛЯ РАБОТЫ С АФИ (АКТИВНЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ ИНГРЕДИЕНТАМИ)

Круглые вибросита Vibrowest используются для получения продукции высокого качества и удаления посторонних включений при работе с АФИ, вспомогательными веществами и готовыми порошками для фармацевтического применения. Конструкция вибросита соответствует требованиям GMP и разработана таким образом, чтобы свести к минимуму наличие мертвых зон, гарантируя высокие гигиенические характеристики и неизменно высокое качество продукта. Продуманная конструкция сита без мертвых зон также существенно упрощает его обслуживание и повышает эффективность процесса в целом.

- Обеспечивается полная защита от пыли во время проверочного просеивания.
- При работе с сильнодействующими АФИ (HPAPI) можно использовать систему безразборной мойки CIP, оснащенную моющими головками.
- Доступны пакеты документации по аттестации установленного оборудования (IQ, OQ и PQ).
- Все поверхности вибросит, контактирующие с продуктом, изготовлены из нержавеющей стали марки 316L и тщательно отполированы, чтобы гарантировать соответствие самым строгим гигиеническим стандартам.

Сфера применения оборудования Vibrowest в фармацевтической промышленности:

- Антибиотики.
- Аспирин.
- Нефасованные фармпрепараты.
- Гормоны.
- Инъекционные лекарственные средства.
- Липиды.
- Литий.
- Микросферы.
- Пептиды.
- Белки.
- Стероиды.
- Витамины.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ТАБЛЕТОЧНЫХ ФОРМ

Фармацевтические компании сталкиваются с большими трудностями при прессовании таблеток, если в порошках присутствуют неоднородные по размеру частицы. Все модели вибрационных сит для фармацевтического применения могут с легкостью устранить эту проблему. Это положительно сказывается на качестве готового продукта и повышает производительность таблеточных прессов. Круглые сита позволяют удалить все мелкие частицы из гранулированного материала, в результате получаются более однородные по форме и имеющие лучший внешний вид таблетки. Оборудование, выпускаемое компанией Vibrowest, также может использоваться для очистки жидких фармацевтических препаратов, при которой удаляются все нерастворенные частицы медикаментов.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ПОРОШКОВ

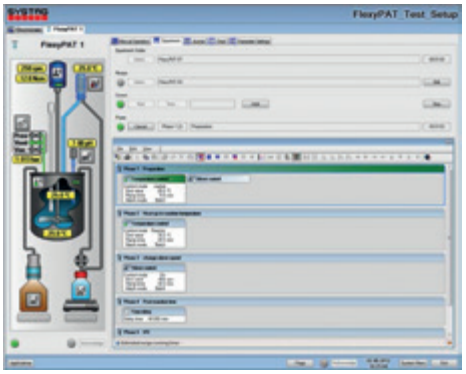
Производители гранулированных порошков для фармацевтической промышленности ранее широко применяли просеивающие устройства с ручным управлением. Это была дорогостоящая, затратная по времени и труду производственная операция, при которой не было возможности гарантировать высокое качество готового продукта. Современные виброситa имеют низкие эксплуатационные затраты и при этом гарантируют высокую точность технологического процесса. На прецизионный просев всех сыпучих фармацевтических продуктов требуется минимальное время.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ЗАМЕДЛЕННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

Производители лекарственных средств с замедленным высвобождением требуют, чтобы гранулы продукта, который они будут использовать в своем производстве, соответствовали микронному размеру. Это порошки с очень мелкими частицами сферической формы. Они поставляются в больницы и другие медицинские учреждения, где их добавляют в растворы для инъекций, назначенные пациентам. Если сферические частицы слишком малы, лекарственное средство может высвободиться в организме пациента слишком быстро. Если они слишком большие, то повышаются риски того, что лекарственный препарат не сможет пройти через иглу при инъекции. Таким образом, прецизионность при изготовлении микросфер является обязательным требованием. Для суспензионных препаратов Vibrowest разработала линейку сит серии MR, которые позволяют удалять частицы, превышающие заданный размер, из жидкости.

ЭФФЕКТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ АВТОМАТИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ

Материал предоставлен компанией Systag





ВВЕДЕНИЕ

В наши дни неотъемлемым требованием, предъявляемым к контрактым площадкам и производителям АФИ, является эффективность процесса разработки нового препарата. Новый продукт/процесс необходимо выводить на рынок все быстрее и быстрее. Однако научно-исследовательские отделы страдают от нехватки ресурсов, а сотрудники часто перегружены решением вопросов административного характера. Зачастую времени на разработку технологических процессов не остается. Затратные по времени рутинные виды работ, например дозирование, термическая обработка и другие типовые процессы, могут выполняться автоматически в лабораторном реакторе, а человеческие ресурсы могут быть задействованы для выполнения более значимой работы.

В ЧЕМ ПРЕИМУЩЕСТВО УПРАВЛЯЕМЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ РЕАКТОРОВ?

Управляемый лабораторный реактор FlexyPAT производства SYSTAG и рабочая станция для параллельного синтеза FlexyCUBE могут существенно облегчить работу химикам, предоставляя доступ к автоматизированным процессам уже на самых ранних стадиях разработки. Благодаря возможности хранения данных и их визулизации сложные вычисления могут быть выполнены уже на самых ранних стадиях разработки. В то же время процессы становятся гораздо более продуманными и воспроизводимыми. Случайные явления, а также зависимость от человеческого фактора могут быть легко устранены. Благодаря широкому использованию автоматизации с индивидуально разработанными реакторными системами удается существенно повысить эффективность работы отдельной группы сотрудников или даже целого отдела научных исследований.

В настоящее время такая стратегическая оптимизация процессов, как QbD или DoE, становится неотъемлемой составляющей для быстрой и эффективной разработки и оптимизации процессов. Регламентирование и отслеживание данных все чаще и чаще применяется на самых ранних этапах

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

разработки. Следование текущим нормам и стандартам невозможно без использования контролируемых лабораторных реакторов.

В ЧЕМ ЗАКЛЮЧАЮТСЯ СИЛЬНЫЕ СТОРОНЫ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ SYSTAG?

Компания SYSTAG разрабатывает и производит модульные решения для автоматизации процессов химического синтеза, начиная от лабораторного оборудования и заканчивая оборудованием пилотного масштаба. Компания SYSTAG имеет более чем 50-летний опыт разработки инновационных систем автоматизации, основанный на тесном сотрудничестве с предприятиями химической и фармацевтической промышленности. Мы разрабатываем и производим автоматизированные лабораторные системы, выполненные по индивидуальным проектам под определенные требования заказчика. Применяемые технологии являются сильной стороной компании SYSTAG, что непременно сказывается на повышении эффективности процессов наших заказчиков.

КАКОВА СТАНДАРТНАЯ ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ РЕАКТОРОВ FLEXYCUBE И FLEXYPAT?

Применение реакторов с системой автоматизации возможно в любой сфере, где требуется использование лабораторных реакторов с рубашкой для

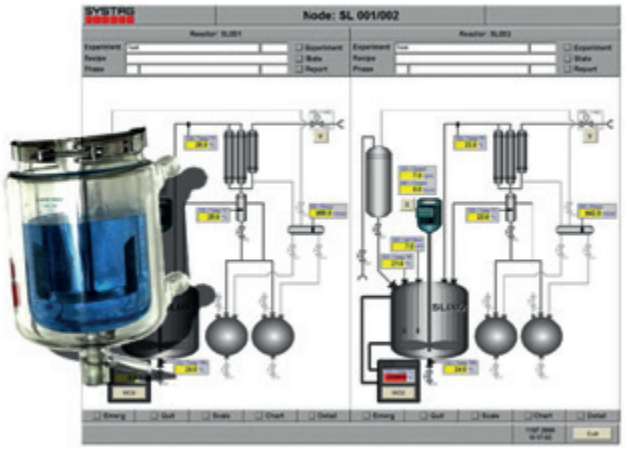


Рисунок 2. **FlexySys – интерфейс ПО**

контроля температуры и круглодонных колб для проведения химических реакций.

Автоматизированные системы SYSTAG могут применяться для проведения исследований в области химии и фармацевтики, где требуется работать с образцами в миллилитрах, а также при разработке процессов, исследованиях температурной стабильности и масштабировании процессов, где требуется работать с киллограмами.

Одной из типовых областей применения реакторов с ситемой автоматизации является проведение реакции гидрирования или оптимизация процессов кристаллизации с повторяющимися циклами нагревания/охлаждения с учетом определения метастабильной зоны. Данные процессы требуют применения анализаторов мутности для определения точки помут-

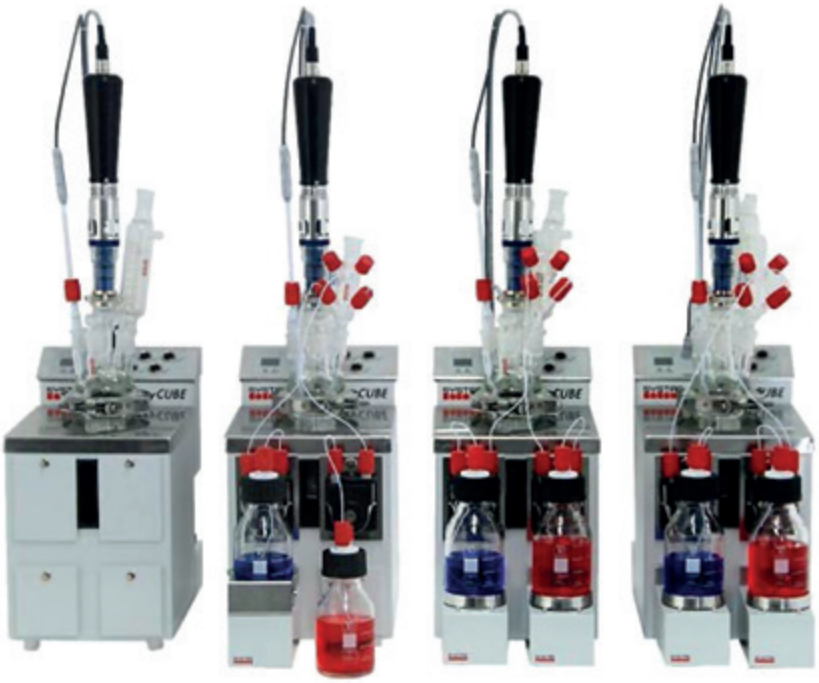


Рисунок 1. **FlexyCUBE – рабочая станция для параллельного синтеза**

нения и растворимости продукта при разных концентрациях в зависимости от температуры. Выполнение данных измерений традиционным ручным способом требует проведения большого количества тестов, кропотливой записи результатов и выполнения их последующего анализа. Применение контролируемых систем позволяет выполнять все операции автоматически. Речь идет не только о чередовании циклов нагрева и охлаждения, но и о точном дозировании компонентов для получения данных об их растворимости при различной концентрации. В сравнении с традиционным способом применение автоматизированных систем позволяет существенно экономить время. Более того, полученные с применением автоматических систем данные отличаются высокой воспроизводимостью, что является критически важным параметром с точки зрения повышения эффективности процессов.

Также процесс гидрирования является и ярким примером того, что, помимо экономии времени, важную роль играет безопасность процессов. Для гидрирования и для реакций с газами в целом чувствительность к кислороду воздуха часто имеет первостепенное значение. Все фазы данного процесса выполняются автономно с помощью автоматизированного лабораторного реактора и при строгом соблюдении стандартных рабочих процедур (SOP), что грантирует поддержание высокого качества в любой точке процесса. Более того, при гидрировании крайне важным параметром является возможность записи точного объема газа.

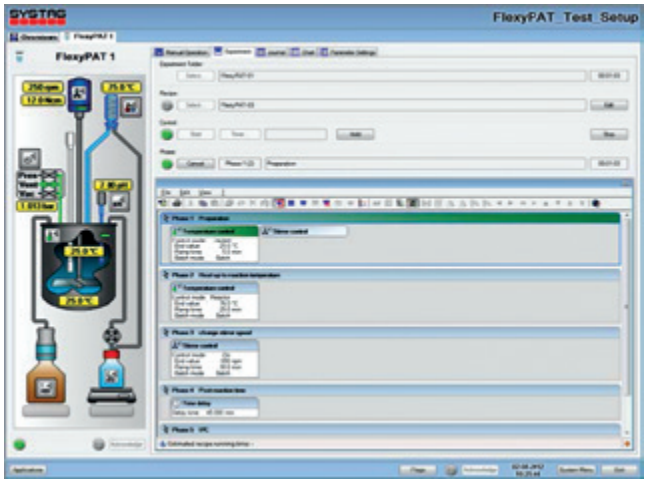


Рисунок 3. FlexySys – пользовательский интерфейс (окно методики)

В дополнение к высокоточному регулированию температуры и давления существенным моментом является возможность перемешивания при разных скоростях, что позволяет точно контролировать количество поглощаемого в ходе реакции газа. Это является необходимым при исследовании активности различных катализаторов (скрининг катализатора). Непрерывный и надлежащий контроль необходимых параметров не представляется возможным без использования системы автоматизации. Именно в таких ситуациях проверенные решения от компании SYSTAG демонстрируют свои преимущества.



Рисунок 4. PPR – система параллельного подключения реакторов высокого давления

FPS
FOOD PHARMA SYSTEMS

ИНТЕГРИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ В БАРЬЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ РАБОТЫ С ТОКСИЧНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ: ОТ R&D ДО ПРОМЫШЛЕННОГО МАСШТАБА

АВТОРЫ

S. Butti,

технический специалист
отдела продаж FPS

Е.А. Полуянов,

главный технолог
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

Производство и переработка высокоактивных фармацевтических субстанций (ВАФС/HPAPI) и токсичных продуктов требует полной изоляции продукта от окружающей среды для защиты операторов. Для этого используются специальные барьерные системы – изоляторы, внутри которых поддерживается разрежение и в большинстве случаев используется турбулентный поток воздуха.

Как правило, оператор имеет доступ к рабочей зоне изолятора через перчаточные порты или защитный «полукостюм».

Различные конструктивные решения и конфигурации изоляторов дают возможность работать с веществами, имеющими ПДК рабочей зоны (OEL) от 10 до 0,01 мкг/м^3.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Изоляторы для производства высокоактивных и токсичных АФИ имеют широкую область применения: они используются для лабораторных исследований, синтеза, фильтрации и сушки, для загрузки веществ в промышленный реактор, для выгрузки продукта из различного технологического оборудования (фильтра или сушилки), для измельчения и микронизации как в пилотном, так и промышленном масштабе и для других процессов.

Компания Food and Pharma Systems (FPS) занимается разработкой и производством оборудования для фармацевтической и химической промышленности. Компания производит широкий перечень оборудования для тонкого размола, а также изоляторы для работы с высокоактивными и токсичными АФИ и для работы в стерильных условиях.

Компания в своей деятельности придерживается стратегии разработки систем, позволяющих оптимизировать энергопотребление и достичь более высоких результатов. Более 15 лет FPS разрабатывает линейки собственного оборудования, внедряя инновационные решения и новейшие технологии для фармацевтической, пищевой и химической промышленности.

Гибкость и ориентированность на потребности заказчика – важнейшие стратегические направления развития компании.

- Компания предлагает заказчику не стандартные решения, а те, которые идеально соответствуют его потребностям.
- Отправной точкой при разработке любого проекта является не модельный ряд оборудования, а потребности заказчика.
- Специалисты компании имеют богатый опыт работы, но при этом ежедневно узнают что-то новое и разрабатывают новые решения.

СТРАТЕГИЯ ВЫБОРА БАРЬЕРНОЙ СИСТЕМЫ

1. Определяют уровень токсичности вещества (Occupational Exposure Band, OEB), с которым собираются работать:

OEB	Диапазон OEL (ПДК рабочей зоны), мкг/м^3	Токсикологические / фармакологические свойства
OEB 1	>1000	Опасные и/или с низкой фармакологической активностью
OEB 2	100–1000	Опасные и/или с умеренной фармакологической активностью
OEB 3	10–100	Умеренно токсичные и/или с высокой фармакологической активностью
OEB 4	1–10	Токсичные и/или с очень высокой фармакологической активностью
OEB 5	1–0,1	Чрезвычайно токсичные и/или с черезвычайно высокой фармакологической активностью

2. Для того чтобы определить дизайн барьерной системы, проводят анализ по целевой эффективности изоляции (Containment Performance Target, CPT). CPT основывается на OEL материала, с которым производится работа. Эффективность изоляции определяется как содержание частиц в воздухе, измеренное вокруг загрязненного устройства и оператора (средневзвешенная концентрация за 8 ч в мкг/м^3). Методология оценки детализирована в руководстве ISPE «Надлежащая практика – Оценка эффективности сдерживания частиц фармацевтического оборудования» (Good Practise – Assessing the particulate containment performance of pharmaceutical equipment), вторая редакция, разработана комитетом SMEPAC (Комитет по стандартизированному измерению концентрации частиц в воздухе у оборудования).
3. Определяют потенциал воздействия, который зависит от нескольких факторов:

- от массы токсичного вещества, с которым предстоит работать: в микроколичестве (до 10 г), в небольшом количестве (до 10 кг), в среднем количестве (до 100 кг) или в большом количестве (более 100 кг);
- от того, насколько пылится вещество при работе (например, при взвешивании или пересыпании) или сколько пыли выделяется при обработке вещества (например, на мельнице): условно делится на низкий, средний и высокий потенциал;
- от продолжительности манипуляции с веществом: короткое время (менее 30–40 мин) и длительное время (свыше 40 мин).

С помощью таблицы, представленной ниже, определяют потенциал воздействия:

Таблица 1.

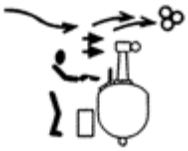
Потенциал распределения для твердых веществ

Потенциал воздействия / Масса токсичного вещества	Низкий	Средний	Высокий
Микро (<10 г)	EP0 / EP0	EP0 / EP1	EP1 / EP2
Небольшое количество (<10000 г)	EP1 / EP1	EP1 / EP2	EP2 / EP3
Среднее количество (<100 кг)	EP1 / EP2	EP2 / EP3	EP3 / EP4
Большое количество (>100 кг)	EP2 / EP3	EP3 / EP4	EP3 / EP4
Продолжительность манипуляций	Короткое время / Длительное время		

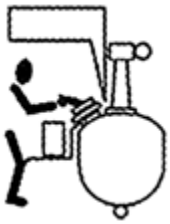
4. На основании уровня токсичности вещества (OEB) и потенциала воздействия (EP) определяют номер барьерной стратегии по следующей таблице:

Группа опасности	Максимально допустимое значение	OEB (твердое вещество)	EP0	EP1	EP2	EP3	EP4
A	1000–10 000 мкг/м^3 пыли	OEB 1	1	1	1	1	2
B	100–1000 мкг/м^3 пыли	OEB2	1	1	2	2	3
C	10–100 мкг/м^3 пыли	OEB3	2	2	3	3	4
D	1–10 мкг/м^3 пыли	OEB4	2	3	3	4	4
E	0,01–1 мкг/м^3 пыли	OEB5	3	4	4	4	4
F	<0,01 мкг/м^3 пыли	4	5	5	5	5	5

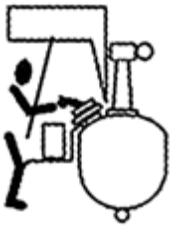
Номер барьерной системы обозначает следующее:



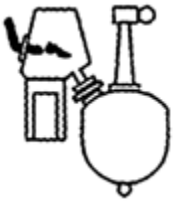
Стратегия 1: Контролируемая общая вентиляция.



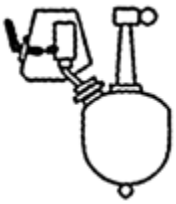
Стратегия 2: Местная вытяжная вентиляция.



Стратегия 3: Местная вытяжная вентиляция с барьерами.



Стратегия 4: Открытые операции в простом изоляторе (в том числе гибком) или соединения с высокой степенью герметичности между двумя закрытыми емкостями.



Стратегия 5: Открытые операции в высокогерметичном изоляторе или закрытые операции в простом изоляторе.

Стратегия 6: Роботизированные операции в высокогерметичном изоляторе (для сверхтоксичных веществ).

Рассмотрим более подробно конструкционные особенности изоляторов FPS (рисунок 1). Конструкция полностью из нержавеющей стали согласно требованиям cGMP.

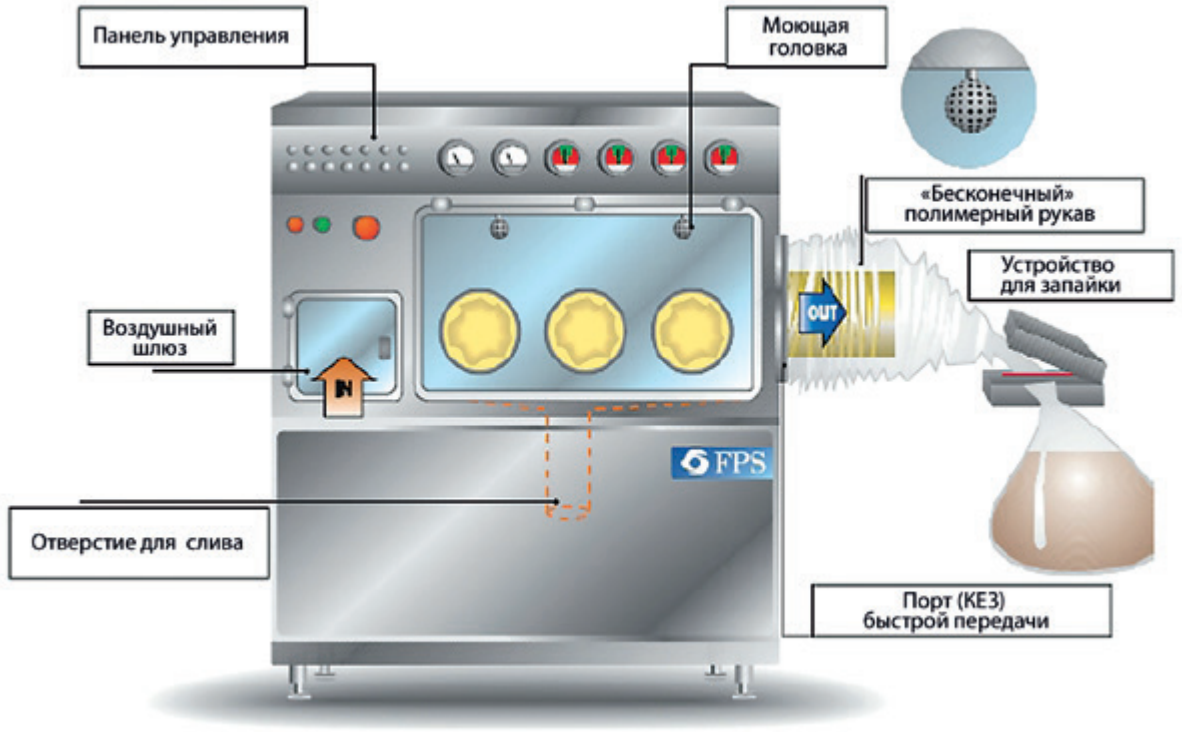


Рисунок 1. Особенности изоляторов FPS

1. Все используемые материалы, включая уплотнения, прокладки, перчатки, одобрены FDA.
2. Возможна конфигурация изолятора как для высокоактивных и токсичных АФИ, так и для работы со стерильными продуктами.
3. Во время работы в камере изолятора поддерживается постоянное отрицательное или положительное давление в зависимости от применения.
4. Возможно использовать следующие системы трансфера веществ и материалов для сохранения герметичности в изоляторе:
   - воздушный шлюз как на входе материалов в изолятор, так и на выходе (рисунок 2);
   - порт быстрой передачи (RTP) (рисунок 3);



Рисунок 2. **Воздушный шлюз как на входе материалов в изолятор, так и на выходе**

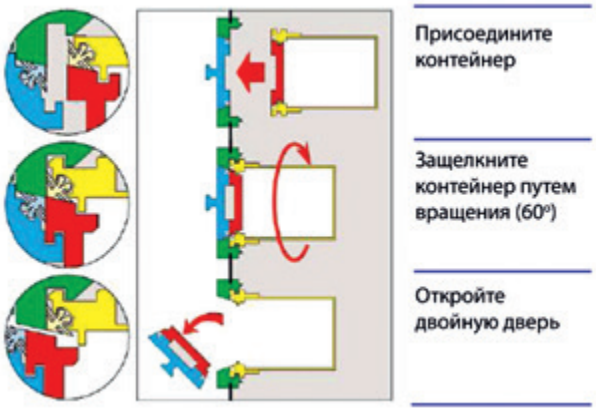


Рисунок 3. **Порт быстрой передачи**

   - «бесконечный» полимерный рукав на входе и на выходе, в том числе с интегрированным устройством, запаивающим рукав с двух сторон (рисунок 4);



Рисунок 4. **«Бесконечный» полимерный рукав**

   - сплит-клапан для загрузки и выгрузки веществ (рисунок 5);



Рисунок 5. **Сплит-клапан для загрузки и выгрузки**

   - система Hicoflex® для загрузки и выгрузки веществ (рисунок 6);

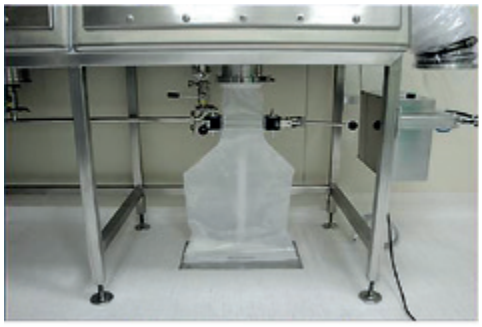


Рисунок 6. **Система Hicoflex® для загрузки и выгрузки веществ**

   - система Ezidock™ для загрузки и выгрузки веществ (рисунок 7);
6. Возможно проводить очистку и стерилизацию на месте (CIP/SIP).

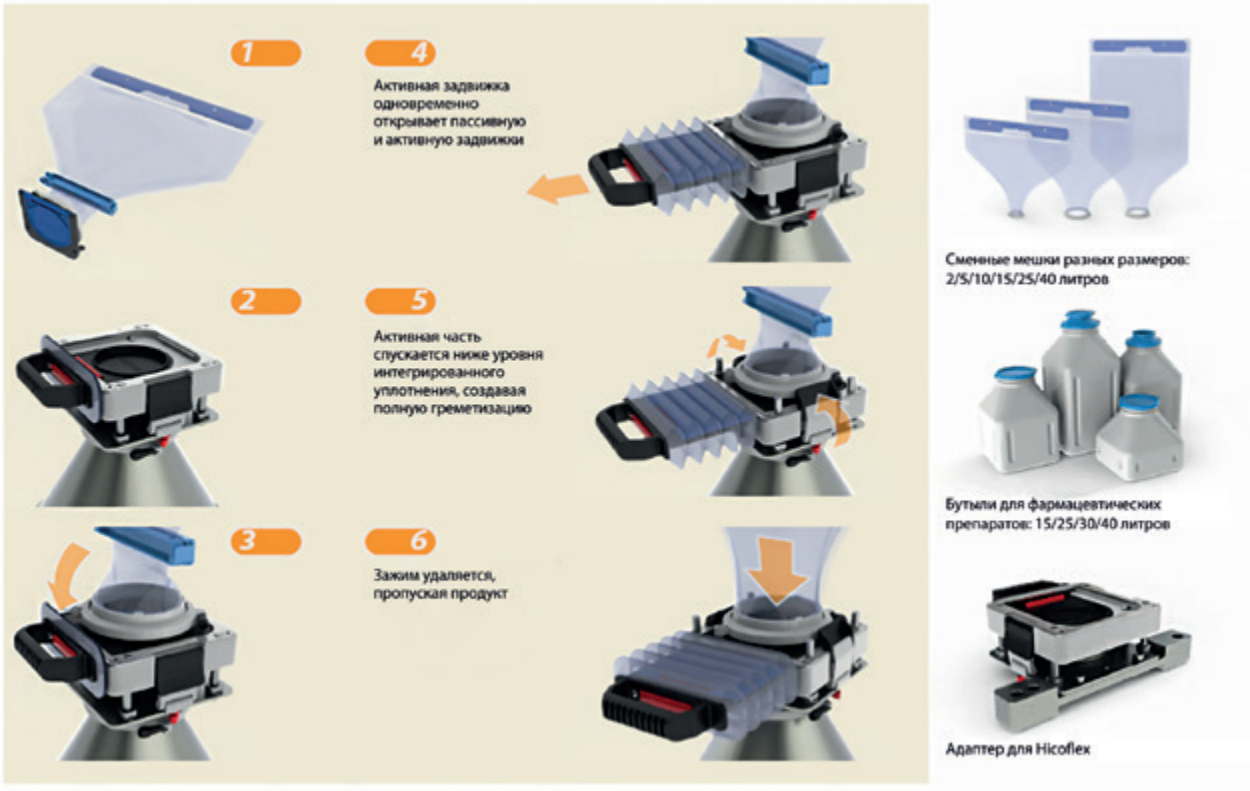


Рисунок 7. **Система Ezidock™ для загрузки и выгрузки веществ**

7. Доступна конфигурация во взрывозащищенном исполнении (ATEX).
8. Возможно обеспечить класс чистоты ниже ISO5 / Class A / Class 100 / Class M3.5.
9. Возможно обеспечить конструкцию изолятора, позволяющую работать с веществами с OEL <0,01 мкг/м^3 (8 часов, средневзвешенное значение) (OEB 5).
10. Оборудование можно протестировать на утечку в соответствии с ISO10648-2 ниже класса 1 или AGS-2007 с 0,5% утечкой по объему.
11. Изолятор может обеспечить уровень стерильности ниже 6log (SAL 10^{-6}), используя генератор паров перекиси водорода.

КРИТИЧЕСКИЕ ФАЗЫ РАЗРАБОТКИ ИЗОЛЯТОРОВ FPS

Разработку и производство готового изолятора можно разбить на следующие стадии.

- Предварительное обсуждение: обсуждение URS и разработка концептуальных схем.
- Внешний дизайн на стадии тестирования эргономичности и оценка рисков (Mock up test).
- Детальный инжиниринг.
- Производство.
- Обзор и подготовка документов.
- FAT (тестирование на заводе-изготовителе).
- Транспортировка и установка.
- SAT (тестирование на площадке заказчика).
- Квалификация (стадии IQ/OQ).
- Обучение работе операторов и обучение техническому обслуживанию.
- Квалификация (стадия PQ).
- Проверка эффективности изоляции (SMEPAC).
- Составление программы технического обслуживания.

Остановимся более подробно на первых этапах разработки:

1. Предварительное обсуждение

Во время предварительного обсуждения ещё до моделирования оборудования производитель изоляторов проводит с заказчиком оценку данных по процессу и оценку рисков. Необходимо также учитывать, будет ли интегрироваться какое-либо технологическое оборудование в изолятор, какое это оборудование и каким образом оно будет интегрировано. Очень важно на этом этапе обозначить

границы ответственности между производителем изолятора, производителем оборудования и заказчиком. На этом же этапе производится оценка технического решения на соответствие требования GMP и безопасности. Далее происходит этап разработки концептуальной схемы оборудования (P&ID) и концептуального общего вида оборудования (General Arrangement Drawing), а также разработка концепции системы управления.

2. Моделирование

Менеджеры проектов FPS совместно с производственной группой сначала разрабатывают 3D-модель предлагаемого оборудования, а затем изготавливают эту модель из дерева в натуральную величину для проверки эргономики и удобства выполнения планируемых операций (Mock up test). На этом этапе заказчик может попросить внести любые необходимые доработки (рисунок 8).

В тех случаях, когда в изолятор необходимо встроить технологическое оборудование, заказчик совместно с производителями определяют возможный порядок действий.

1. В первую очередь производят интегрируемое технологическое оборудование, затем его транспортируют на завод FPS или специалисты FPS выезжают к производителю оборудования с заранее подготовленным макетом и проводят тест на эргономичность уже с готовым оборудованием. В этом случае снижаются риски неправильной интеграции оборудования, но увеличиваются сроки поставки (рисунок 9).
2. В том случае, когда сроки поставки короткие или нет возможности транспортировать технологическое оборудование на завод FPS, проводят проверку эргономичности с муляжом оборудования (рисунок 10).



Рисунок 9. **Интеграция готового оборудования в макет изолятора**

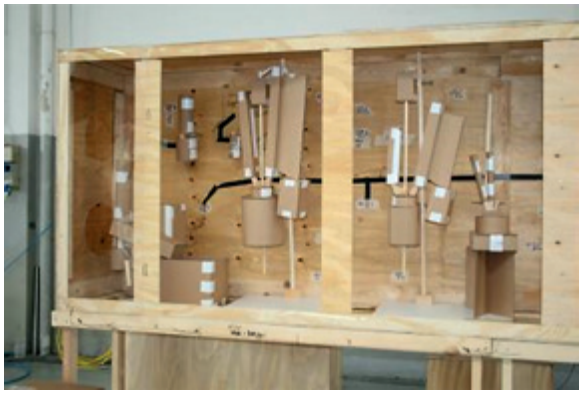


Рисунок 10. **Использование муляжей оборудования для теста на эргономичность**

3. Производство и контроль качества

После полного согласования проекта заказчиком производственная группа изготавливает оборудование в соответствии с высочайшими стандартами качества. Система менеджмента качества FPS гарантирует, что весь технологический процесс соответствует требованиям ISO 9001 и стандартам GMP.

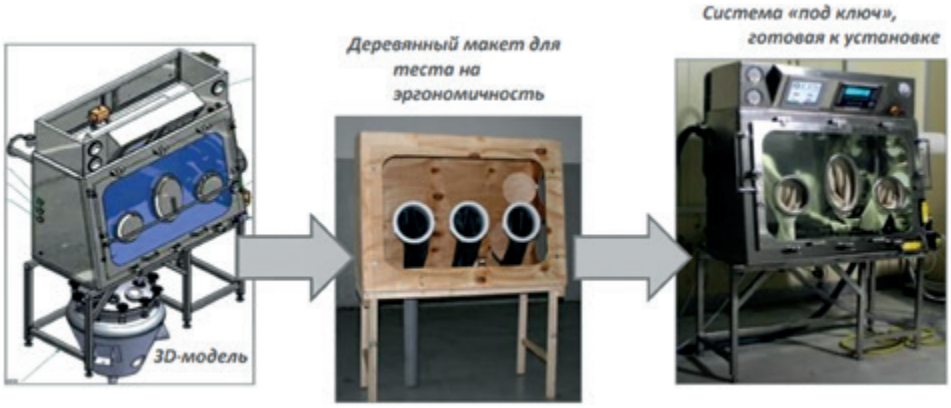


Рисунок 8. **Изготовление 3D-макета изолятора в натуральную величину**

4. Испытания

Каждое изделие перед отправкой заказчику тестируется на площадке производителя (FAT-испытание) для подтверждения соответствия его характеристик техническому заданию (URS). Испытательный центр FPS полностью оборудован для проведения тестирования согласно требованиям SMEPAC (как части FAT) с целью оценки целевой эффективности изоляции (CPT).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Когда речь идет о работе с высокоактивными и опасными соединениями в процессе разработки нового препарата, его производства и контроля качества, а также в ходе научных исследований, изоляторы FPS являются незаменимым решением.

Ключевыми преимуществами систем FPS являются:

- максимальная гибкость на протяжении всего процесса;
- комфорт для оператора, который может осуществлять управление всем процессом с помощью единой комплексной системы;
- высокий уровень защиты, гарантированный на каждом этапе процесса.

Обобщим несколько ключевых моментов при разработке новой барьерной системы.

- Необходимо уделять большое внимание определению границ проектирования (как будет осуществляться загрузка и выгрузка материала, как будет интегрирован интерфейс оборудования).
- Необходимо детально проанализировать технологический процесс как с точки зрения безопасности, так и с точки зрения сохранения герметичности.
- Необходимо оценить все аспекты изоляции: от оператора до обслуживающего персонала.
- Очень важно подробное обучение операторов и обслуживающего персонала.
- Необходимо составить правильный план обслуживания оборудования.
- Необходима надлежащая оценка эффективности изоляции оборудования: как в качестве части квалификации, так и в качестве части обычного процесса обслуживания оборудования или верификации.
- Большое внимание должно быть уделено гибким частям барьерных систем, таким как перчатки или «полукостюм», с помощью специальных процедур или приборов.

Ежедневно появляется множество новых испытаний, которые специалисты FPS обсуждают и оценивают, чтобы вывести целевой уровень защиты на высочайший уровень:

- высокий уровень изоляции для стерильных процессов (в непрерывном улучшении);
- снижение ручного вмешательства внутри изоляторов;
- совершенствование существующих интерфейсов как внутри, так и снаружи;
- улучшение общей возможности очищения внутренних частей;
- проверка герметичности изолятора в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. EN 14175. Biosafety cabinet (Part 1,2,3 and 6). – Шкаф биологической защиты (части 1, 2, 3 и 6).
2. ISO 14644-7. Separative devices (clean air hoods, glove boxes, isolators, and minienvironments). – Изолирующие устройства (укрытия с чистым воздухом, перчаточные боксы, изоляторы и мини-окружения).
3. ISO 10648-1. Containment enclosure – Part 1 Design principles. – Боксы и камеры защитные герметичные. Часть 1. Принципы проектирования.
4. ISO 10648-2. Containment enclosure – Part 2 Classification according to leak tightness and associated checking method. – Боксы и камеры защитные герметичные. Часть 2. Классификация в зависимости от герметичности и соответствующие методы контроля.
5. AGS-G001-2007.
6. Containment Systems a design guide (IchemE editor). – Руководство по проектированию барьерных систем.
7. SMEPAC guideline (second edition). – Руководство SMEPAC (второй выпуск).

Все изображения и чертежи взяты из архива выполненных проектов FPS.

FPS
FOOD PHARMA SYSTEMS

МЕТОДЫ СУШКИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ (ОБЗОР)

Материал предоставлен компанией BUCHI

ВВЕДЕНИЕ

Удаление растворителя или концентрирование является важным процессом для фармацевтической, химической и биотехнологической отраслей, особенно в тех случаях, когда необходимо уменьшить количество растворителя для облегчения определения состава или анализа представляющих интерес молекул. Использование методов сушки или концентрирования широко применяется для исследования натуральных продуктов, лекарственных препаратов и других химических соединений, например усилителей вкуса и ароматизаторов, однако препаративная очистка остается наиболее распространенным способом [1, 2].

Различные коммерческие системы для охвата широкого диапазона применения разрабатывались на протяжении многих лет, но из-за большого разнообразия образцов и растворителей в настоящее время универсального решения по-прежнему не существует [1, 2].

Специфике одного процесса могут удовлетворять несколько методов сушки, и, следовательно, можно использовать несколько приборов для одной и той же цели. Таким образом, выбор наиболее подходящего решения зависит от нескольких критериев. Основные условия выбора: прибор должен иметь возможность обрабатывать необходимое количество образцов, позволять обрабатывать разнообразные типы образцов и соответствовать различным требованиям к продуктам [1, 2]. Как производитель лабораторного оборудования компания BUCHI предлагает несколько типов систем концентрирования и сушки: лиофильные сушилки, распылительные сушилки, ротационные испарители и испарители с вихревым перемешиванием (рисунок 1).

Постоянное развитие новых систем и связанных с ними аппаратных средств – вакуумных насосов, конденсоров, технологий нагрева и интерфейсов – облегчает взаимодействие пользователя с прибором, что позволяет повысить производительность упаривания, сохранность образца и увеличить степень восстановления растворителя, тем самым снижая воздействие на окружающую среду процессов упаривания/концентрирования [1, 2].

Использование новейшего оборудования, а также современное понимание процесса на теоретическом, прикладном и практическом уровне позволяют оптимизировать методы для более быстрой сушки или концентрирования образцов.

Как лидер рынка в области упаривания, BUCHI предлагает современные решения для каждой задачи (рисунок 1), используя такие критерии, как время сушки, энергопотребление, масштабируемость, производительность (рисунок 2). Накопленный опыт компании позволяет подобрать оптимальное решение.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Рисунок 1. Решения BUCHI для упаривания. Слева направо: (a) Lyovapor L-300 – первая лиофильная сушилка с неограниченной емкостью конденсора, (b) Rotavapor R-300, (c) распылительная сушилка Mini Spray Dryer B-290, (d) система параллельного упаривания Multivapor P-12



Рисунок 2. Критерии выбора наиболее подходящего процесса упаривания/концентрирования

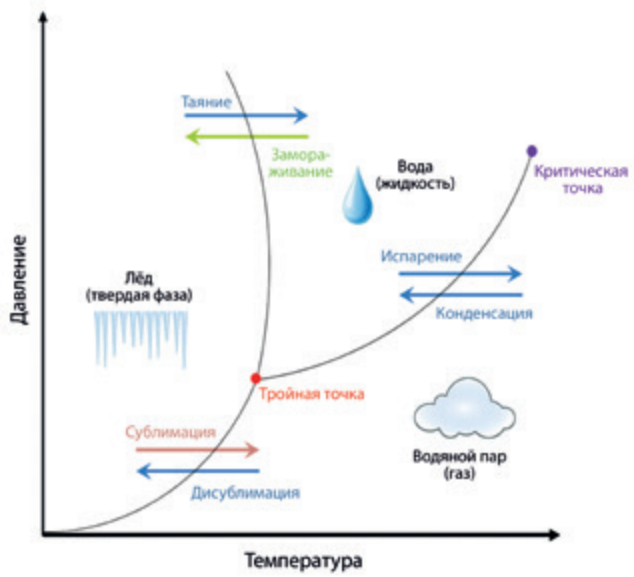


Рисунок 3. Диаграмма состояния воды

ОСНОВЫ ТЕОРИИ УПАРИВАНИЯ

Термодинамические основы

В зависимости от давления и температуры любое вещество может находиться в трех агрегатных состояниях: твердом, жидком и газообразном. Связь между давлением и температурой для определенного вещества показана на фазовых диаграммах (рисунок 3). При нагреве в условиях постоянного давления выше тройной точки твердое тело достигнет точки плавления и перейдет в жидкое состояние; дальнейший нагрев приведет к повышению температуры до достижения точки кипения, затем жидкость начнет кипеть, превращаясь в газ [1, 2]. Когда аналогичное действие выполняется при температуре и давлении ниже тройной точки, образец будет не плавиться, а сублимироваться. Тепловая энергия, передаваемая образцу при низком давлении, является достаточной для плавления, однако давление при этом слишком низкое для образования жидкости, и поэтому растворитель будет сублимироваться в газ [1, 2]. Поскольку агрегатное состояние вещества определяется как нагревом, так и давлением, температура, при которой происходит кипение или испарение, определяется давлением. Следовательно, снижение давления может привести к уменьшению температуры кипения растворителя и к испарению, возникающему при более низких температурах. Системы низкого давления обычно используются для работы с термочувствительными образцами, чтобы уменьшить температуру кипения, тогда испарение происходит при более низкой, более безопасной температуре. Аналогичные рассуждения действительны для процессов сублимации [1, 2].

Сушка

Сушка – это процесс отделения жидкости от твердого вещества. Газ (пар) удаляется из вещества и далее из сушилки. При работе в вакууме в закрытой систе-

ме или при использовании органического растворителя пары растворителя необходимо конденсировать и восстанавливать. В начале процесса сушки, когда образец достаточно влажный, скорость сушки зависит от давления пара, давления в системе и от тепла, подаваемого в систему. Однако как только жидкость испаряется с поверхности, возникает момент, когда теплопроводность твердого тела и путь выхода влаги изнутри на поверхность (пористая структура, гигроскопичность) начинают оказывать большое влияние на испарение [1].

Если принять во внимание, что давление паров твердого вещества совершенно незначительно по сравнению с давлением в жидкости, полное высушивание вещества становится теоретически возможным. Однако при сушке твердого вещества может возникнуть несколько трудностей, так как образец может быть в нескольких различных формах: влажное твердое вещество, мягкая масса или паста, раствор, суспензия – для каждого состояния необходимо выбрать наиболее подходящий процесс [1].

РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ СУШКИ

В настоящее время существует широкий выбор различных устройств для упаривания и сушки. В лабораторных условиях они используются главным образом в случаях, когда необходимо удалить как можно больше нежелательного растворителя при сохранении образца. Если в научных исследованиях и контроле качества синтеза в основном используются ротационное упаривание и параллельное упаривание (с вихревым перемешиванием), то для подготовки образцов и перед процессом экстракции дополнительно может быть применена распылительная и лиофильная сушки.

Ротационные испарители

Ротационные испарители разработаны для быстрого и деликатного упаривания с конденсацией растворителей.

Они обычно используются для отделения легколетучих растворителей от твердых веществ или жидкостей с высокой температурой кипения. Ротационное упаривание также можно использовать для удаления растворителя на конечной стадии реакции или разделения смешанных растворителей, осаждения суспензий или растворов, концентрирования жидкостей, рекристаллизации образца для удаления примесей, сушки порошков или гранулята, синтеза химических веществ, экстракции по методу Сокслета или регенерации растворителей.

Во время вращения колбы с образцом площадь поверхности испарения увеличивается, тем самым улучшается теплопередача и ускоряется процесс. При вращении также облегчается испарение и предотвращается локальный перегрев и образование корки, а также уменьшается запаздывание кипения и снижается вспенивание. Вакуум снижает температуру кипения, что позволяет осуществлять низкотемпературное упаривание [1].

Ротационные испарители можно ранжировать по размерам от настольных/лабораторных приборов (200 мл – 5 л) до промышленных приборов объемом 20–50 л. Стандартно они состоят из следующих компонентов:

- вакуумный насос для снижения давления в системе;
- нагревательная баня для управления нагревом емкости с образцом;
- конденсор и циркуляционный охладитель для конденсации испарившегося растворителя и его восстановления;
- емкость для сбора восстановленного растворителя;
- привод вращения колбы и привод для опускания и подъема емкости из нагревательной бани.

Для обеспечения оптимальной производительности упаривания существует эмпирическое правило: разница между температурой охлаждения и кипения, а также между температурой кипения и температурой бани должна составлять 20 °C. Рекомендуется поддерживать следующие температуры – 20/40/60 °C. Тем не менее можно изменить это соотношение, если продукт не должен нагреваться до 40 °C или в случае закипания растворителя при температуре ниже 40 °C при атмосферном давлении. Условия вакуума и охлаждения считаются идеальными, когда конденсат покрывает от половины до трех четвертей высоты конденсора [1].

Выбор наиболее подходящего решения для ротационного упаривания определяется несколькими критериями. Существует широкий спектр решений, удовлетворяющий как базовым, так и специфическим требованиям.

Для концентрирования или восстановления растворителя при сушке или непрерывном упаривании больших объемов можно использовать промышленный ротационный испаритель, например BUCHI Rotavapor R-220 Pro (рисунок 4) или R-250 для обработки до 30 л растворителя в емкостях 50 л. Оба прибора выпускаются также во взрывозащищенном исполнении. Кроме того, для решения конкретных задач пользователей доступны аксессуары, опции расширения и индивидуальные решения для промышленного упаривания.

Для упаривания, концентрирования и сушки в лабораторных условиях мы предлагаем настольный



Рисунок 4. **Промышленная система ротационного упаривания BUCHI Rotavapor R-220 Pro**



Рисунок 5. **Лабораторный ротационный испаритель BUCHI Rotavapor R-300 Pro**

ротационный испаритель BUCHI Rotavapor R-300 (рисунок 5). Его можно использовать для решения широкого спектра пользовательских задач, а также он соответствует самым высоким требованиям к удобству и производительности. Например, датчик пены в комбинации с интерфейсом I-300 / I-300 Pro позволяет автоматически дистиллировать пенящиеся образцы. Датчик автоматически кратко аэрирует систему для предотвращения обильного пенообразования, поддерживая вакуум на постоянном уровне.

Системы параллельного упаривания более эффективны, чем ротационные испарители, если необходимо концентрировать или высушить одновременно много образцов. Системы упаривания с вихревым перемешиванием в целом аналогичны системам ротационного упаривания, но они позволяют параллельно упаривать несколько образцов.

Испарители с вихревым перемешиванием (системы параллельного упаривания)

Испарители такого типа работают по принципу кипения образца в вакууме с одновременным вращением пробирки для создания вихря. Вихрь увеличивает площадь поверхности испарения, улучшает теплообмен и ускоряет процесс. Нагрев можно создавать путем установки нагревательных ламп непосредственно над образцом, через нагревательную среду и/или с помощью нагревательного блока вокруг пробирок. Вихревое движение не может предотвратить пенообразование растворителя, и поэтому необходимо уделять особое внимание тому, чтобы избежать потери образца или перекрестного загрязнения во время процесса [2–4].

Как и для ротационного упаривания, здесь действует правило ΔT=20 °C с небольшим изменением – ΔT=25 °C/20 °C. Такая разность температур является наилучшим вариантом для процессов упаривания с вихревым перемешиванием. Условия вакуума и охлаждения считаются идеальными, когда конденсат покрывает от половины до трех четвертей высоты конденсора [3, 4].

Решения BUCHI для упаривания с вихревым перемешиванием позволяют параллельно концентри-



Рисунок 6. **BUCHI Multivapor P-12 и вакуумный насос V-100**



Рисунок 7. **BUCHI Syncore Analyst R-12 с интерфейсом I-300 Pro и вакуумным насосом V-100**

ровать или упаривать досуха несколько образцов, что облегчает скрининг или пробоподготовку образцов для научных исследований или, например, для контроля качества. Syncore Analyst (рисунок 7) с охлаждающим аппендиксом позволяет концентрировать образцы до заданного объема [3]. Multivapor (рисунок 6) разработан для упаривания досуха или обработки термочувствительных образцов [4]. Syncore Polyvap с нагреваемой крышкой рекомендуется использовать для растворов с высокой температурой кипения [4].

Распылительная сушка

Метод распылительной сушки широко используется для превращения водных или органических растворов, эмульсий, дисперсий и суспензий в сухой порошок. Подобные задачи возникают во многих отраслях промышленности, например в химической, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а также в облости биотехнологий. Сухое молоко, супы быстрого приготовления, растворимый кофе, моющие средства и красители – всего лишь несколько примеров продуктов, созданных при помощи распылительной сушки и незаменимых в повседневной жизни [1].

Первым этапом распылительной сушки является растворение, эмульгирование или диспергирование основного вещества в растворителе или в растворе носителя. Затем образец распыляют в сушильную камеру, где поток горячего сушильного газа способствует испарению растворителя для получения сухих твердых частиц. Эти частицы далее отделяются от потока газа и собираются [1, 5, 6].

Для изменения характеристик конечного продукта можно изменять параметры процесса, особенности подачи и конструкцию оборудования.

Сушилка BUCHI Mini Spray Dryer (рисунок 8) представляет собой лабораторную распылительную сушилку с двухпоточной форсункой для распыления сжатым газом (обычно воздух или азот) жидкости на мелкие капли, которые затем высушиваются в цилиндре. Циклонный сепаратор собирает полученный порошок за счет действия центробежной силы на твердые частицы.



Рисунок 8. **Распылительная сушилка BUCHI Mini Spray Dryer B-290 с инертным контуром B-295**

Распылительная сушка считается высокопроизводительным процессом, так как она выполняется значительно быстрее по сравнению с другими методами сушки. Порошок как результат распылительной сушки дает преимущество в снижении веса и объема. Преобразование жидкого продукта в сухой порошок осуществляется за один шаг, что делает этот метод выгодным с точки зрения затрат, масштабирования и упрощения процесса. Полученный порошок можно сформовать в таблетки/капсулы без измельчения или другой вторичной обработки. Более того, большинство чувствительных к температуре веществ, таких как ферменты, белки, антибиотики и т.д., могут быть высушены распылением без существенной потери активности [1, 5–9].

Вследствие потери продукта на стенках сушильной камеры и с отработавшим газом выход продукта в лабораторных условиях далек от оптимального и, как сообщается, составляет от 20 до 70 % [5–7]. Однако при промышленном производстве выход продукта возрастает пропорционально масштабированию, поскольку потерянная доля составляет меньшую долю объема производства. Недостаток мощности при

распылении жидкости и неэффективность циклона при отделении мелких частиц диаметром менее 2 мкм усложняют производство и извлечение субмикронных частиц. Это необходимо учитывать при разработке систем доставки лекарств, особенно для лекарственных средств внутривенного введения [5–7]. Распылительная сушка в условиях лаборатории также не позволяет получать частицы размером более 50 мкм, аналогичные тем, что производятся в больших масштабах. Это необходимо учитывать во время лабораторных исследований, так как это может привести к затруднениям при масштабировании процесса, когда характеристики растворения частиц и порошков становятся важными параметрами.

Лиофильная сушка

Лиофильная сушка или лиофилизация является эффективным методом сушки образцов. Она использует физический принцип сублимации, представляющий собой переход вещества из твёрдого состояния сразу в газообразное, минуя жидкое. Замороженный образец сушится в вакууме, при этом плавление не допускается. Этот метод широко применяется во многих сферах, так как обеспечивает сохранение чувствительных веществ от разложения, сохранение характеристик продукта и первоначальной формы, сохранение продуктов, требующих быстрой регидратации или доведения до кондиции, необходимой для дальнейшего использования продукта. Вакцины, сухофрукты и овощи, сушеные грибы или растворимый кофе – это лиофилизированные продукты, привычные в повседневной жизни [10].

Важнейшими параметрами при сушке являются давление и температура. Типичный процесс лиофильной сушки состоит из двух этапов – замораживание и первичная сушка. Некоторые образцы могут потребовать вторичную сушку для удаления молекул растворителя, прочно связанных с образцом, и уменьшения влажности. Каждый этап предъявляет конкретные требования к давлению и температуре в зависимости от характеристик образца [10].

Большинство жидких веществ или смесей замерзает, образуя кристаллы. Размер и форма кристаллов льда (если образец на водной основе) зависят от скорости охлаждения и определяют способность к лиофильной сушке; при быстром охлаждении кристаллы льда получаются меньше, а при медленном охлаждении – крупнее. Что касается лиофильной сушки, то маленькие кристаллы льда сложнее удалить из продукта, чем крупные. Тем не менее температура замораживания образца определяется его характеристиками и составом [10].

Образцы обычно замораживаются двумя разными способами; эвтектические смеси содержат вещества, которые замерзают при более низких температурах, чем окружающая их вода. При охлаждении эвтектической смеси вода сначала отделяется от веществ и замерзает, превращаясь в лед. Образец может выглядеть замороженным, но остальные вещества фактически остаются жидкими. Они образуют концентрированные области, которые в конце концов замерзают при температурах ниже точки замерзания воды. Температура, при которой должным образом замерзают все компоненты смеси, называется эвтектической температурой. Это критическая температура образца и максимальная температура, которую образец может выдержать во время процесса лиофильной сушки. Воздействие вакуума на не полностью замороженную эвтектическую смесь может привести к разрушению продукта, поскольку в вакууме незамороженные компоненты расширяются [10].

Другой класс смесей является аморфным и образует при замораживании стеклообразные формы. С понижением температуры образец становится все более вязким, пока в точке стеклования не застывает окончательно, становясь при этом твердым, стеклообразным. У аморфных продуктов критическая для стабильности точка называется температурой коллапса. Температура коллапса обычно несколько ниже температуры стеклования. В целом аморфные продукты представляют собой трудность для лиофильной сушки [10].

Первая фаза сушки – первичная сушка – удаляет из продукта основную часть воды путем сублимации. Необходимо тщательно контролировать температуру образца и подачу тепла. Идеальная температура образца – максимально высокая, чтобы создать предельно возможный перепад давлений пара, но ниже критической для продукта температуры, чтобы продукт оставался замороженным. За счет использования подогреваемых полок заданная температура медленно приближается к установленному значению [10].

Подавляющее количество воды должно удаляться к концу первой фазы сушки. Остаточная влажность продукта может составлять 5–10% и вызвана водой,



Рисунок 9. BUCHI Lyovapor™ L-200 и L-300 с манифолдом

связанной с матрицей образца. На этом этапе больше не должно оставаться льда. На стадии вторичной сушки адсорбированные молекулы воды удаляются путем десорбции. В целях достижения идеальных для десорбции условий требуется минимально возможное давление, а также дальнейшее повышение температуры полки. И опять при выборе температуры полки необходимо учитывать стабильность продукта. Вторичная сушка обычно длится меньше по времени. В конце вторичной сушки содержание влаги в продукте должно быть в пределах от 1 до 5% [10].

BUCHI предлагает две платформы для лиофильной сушки – Lyovapor™ L-300 и L-200 (рисунок 9). Благодаря двойному конденсору с температурой –105 °C Lyovapor™ L-300 обеспечивает неограниченную ледовую емкость и необходимую лиофильную сушку для водных и органических растворителей независимо от объемов образца. Недавно было продемонстрировано, что BUCHI Lyovapor L-300 может сублимировать 9 л смеси ацетонитрил : вода 50:50 за 20 ч. Такое короткое время процесса объясняется отсутствием в конденсоре нароста ледового покрытия благодаря автоматической очистке паром одного конденсора во время использования второго. L-200 представляет собой компактный прибор для высококачественной лиофильной сушки с высоким уровнем автоматизации. С конденсором на 6 кг/–55 °C, интерфейсом управления на русском языке, вакуумным насосом и регулятором вакуума Lyovapor™ L-200 эффективно решает основные задачи лиофильной сушки. На основе этих платформ можно точно подобрать индивидуальное решение под различные требования для достижения максимально возможной эффективности.

Лиофильная сушка – лучший выбор для сохранения широкого спектра фармацевтических препаратов, особенно при недостатке устойчивости в жидком состоянии, строгих требованиях к хранению или если продукт необходим в твердой форме. Она также хорошо подходит для составов, не требующих дальнейшей обработки после сушки, так как они могут быть расфасованы непосредственно в виалы, которые могут быть запечатаны во время сушки по завершении цикла во избежание возможных загрязнений. Преимущества лиофильной сушки заключаются в низкотемпературном процессе, высоком выходе, высокой однородности продукта, а также зачастую в высоком качестве с точки зрения активности, содержания воды и/или устойчивости продукта. Точный контроль процесса позволяет производить продукт самого высокого качества благодаря минимизации риска нарушения внутренних свойств продукта при превышении температуры коллапса, эвтектического расплава или стеклования [8, 9].

Лиофильная сушка обеспечивает существенные преимущества при работе с чувствительными образцами, однако из-за высокой стоимости процесса, длительного времени сушки и ограниченных объемов, связанных с лиофилизацией в производственных масштабах, промышленность рассматривает альтернативные методы сушки, например распылительную сушку.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для решения задач удаления растворителей предлагается широкий выбор систем упаривания и сушки. Чтобы выбрать наиболее подходящий метод, необходимо учитывать не только техническую выполнимость, но также стоимость сушки с точки зрения энергопотребления и времени. Последним, но не менее важным обстоятельством является точное понимание процессов и влияющих факторов, помогающее максимально эффективно использовать возможности выбранного метода сушки. Лабораторные приборы важны как инструменты наблюдения и проектирования, позволяющие изучить образцы и понять характер изменения их свойств в определенных условиях. Как лидер рынка в области упаривания компания BUCHI предлагает самые современные решения и свой обширный опыт, позволяющий клиенту выбирать наиболее подходящее решение для своих задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. The Laboratory Assistant, 3th ed. / BUCHI Labortechnik AG. 2007.
2. I. Abeysena, R. Darrington. Understanding Evaporation and Concentration Technologies. Part 1 / Basic Principles of Commonly Used Evaporation Technologies. 2013. URL: https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/130187-Understanding-Concentration-and-Evaporation-Technology-Part-1-Basic-Principles-of-Commonly-Used-Evaporation-Techniques/ (дата обращения 20.01.2018).
3. Буклет по применению Multivapor, вариант B / BUCHI Labortechnik AG. Март 2012.
4. Брошюра по применению Syncore, вариант A / BUCHI Labortechnik AG. Январь 2012.
5. S. Dursch, S. Diekmann. Microencapsulation by Spray Drying. Handbook of Encapsulation and Controlled Release / Ed. by M. Mishra. 2015. P. 35–46.
6. L.H. Xin, A.S. Mujumdar. Spray Drying and its application in food processing. Handbook of Encapsulation and Controlled Release / Ed. by M. Mishra. 2015. P. 47–69.
7. A. Sosnik, K.P. Seremeta. Advances in Colloid and Interface Science. 2015. P. 40–54.
8. Spray Drying v Freeze Drying. 2015. URL: http://biopharma.co.uk/blog/2015/06/08/spray-drying-v-freeze-drying/ (дата обращения 20.01.2018).
9. Freeze Drying vs Spray Drying: is it essentially quality vs cost? 2017. URL: http://biopharma.co.uk/blog/2017/03/15/freeze-drying-vs-spray-drying-is-it-essentially-quality-vs-cost/ (дата обращения 20.01.2018).
10. Справочник по лиофильной сушке / BUCHI Labortechnik AG. 2017.



BUCHI
SWITZERLAND

Система очистки Reveleris® PREP
Флэш-хроматография и препаративная ВЭЖХ

BUCHI представляет новое поколение высокопроизводительных систем препаративной хроматографии Reveleris®. Система очистки Reveleris® PREP, объединяющая в себе возможности флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ, имеет простой, интуитивно понятный интерфейс и обеспечивает максимальное разделение и высокий выход образца.

- Простое переключение между флэш-режимом и препаративной ВЭЖХ.
- Встроенный детектор по светорассеянию (ELSD).
- Максимальная чистота благодаря синхронизации четырех сигналов детекторов (3 сигнала UV и ELSD) с помощью запатентованной технологии RevealX™.
- Быстрая настройка параметров на большом сенсорном экране 12″.
- Возможность использования флэш-картриджей и препаративных колонок ВЭЖХ, а также стеклянных колонок.
- Скорость потока до 200 мл/мин в препаративном или флэш-режиме.
- Давление до 120 бар в препаративном режиме.

Весь 2018 год
специальная цена от ГК "Фармконтракт"

www.buchi.ru

Quality in your hands

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

МИР БИОТЕХНОЛОГИИ 2018

BIO TECH WORLD

19-21 ФЕВРАЛЯ 2018

МОСКВА | ГОСТИНЫЙ ДВОР
ИЛЬИНКА, 4



ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ ФОРУМА

- Геномное редактирование в биомедицине.
- Постгеномная медицина.
- Генная и вирусная терапия: успехи и проблемы.
- Геномное редактирование в агротехнологиях.
- Умные материалы для диагностики и терапии: возможности синтетической биологии.
- Современная иммунология.
- Регенеративная и клеточная медицина: создание биобанков, депозитариев и коллекций биоматериалов.
- Метагеномика и персонализированная медицина.
- Тканевая инженерия и биопритинг: оборудование, методики и области применения. От клеточных культур к органам. Матриксы для биопринтинга.
- Биоматериалы в биотехнологиях и медицине.
- Биотехнология и проблемы активного долголетия.
- Омиксные технологии в клинической онкологии и болезней мозга. Лечение с позиций биоинформатики, молекулярной/ клеточной биологии и клинической медицины.
- Моноклональные антитела: наука, бизнес, государство.
- Проблемы регулирования биомедицинских клеточных продуктов.
- Инновационные технологии и оборудование в биофармацевтике.

СЕКЦИЯ БИЗНЕС

- Перспективы выхода на рынок новых лекарственных средств, в том числе, на основе моноклональных антител.
- "Умные" продукты питания.
- Современные технологические решения для биофармацевтических производств.

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

Функциональные продукты питания

БИО-продукты пищевой промышленностей и агропромышленного комплекса.
БИО-питание и органические продукты.
Биологически активные добавки и геропротекторы.
Здоровое и детское питание.
БИО-спорт. Спортивное питание.

БИОЛаб

Лабораторно-аналитическое оборудование и биоаналитические комплексы.
"Умные" (smart) лаборатории.
Процессы и аппараты для биотехнологических производств и лабораторных исследований (биореакторы и измерительное оборудование).
Реактивы и наборы.
Питательные среды.
Расходные материалы.

БИОСофт

Программные продукты для биотехнологии.
Большие массивы данных - Big Data.
Облачные технологии и сервисы.
Банки данных в биотехнологии.
IT- решения для биологических задач.

БИОМед

Персонализированная диагностика и лечение.
Биологические и генетические тесты.
Мобильные технологии и индивидуальное диагностическое оборудование.
Медицинские продукты питания.
Биофармацевтика и фармацевтические компании.
Биочипы и биосенсоры.
Генетическая инженерия и биосовместимые материалы.
Биомедицинские и роботические технологии.
Биопрепараты для медицины и косметологии, а также готовые продукты на их основе.

БИОЭкономика

Весь спектр биопродуктов для пищевой промышленностей, агропромышленного комплекса, биогеологии, промышленных производств, а также биоагенты для охраны и восстановления окружающей среды.
Технологии производства.
Альтернативные источники энергии, в т.ч. из возобновляемого сырья.
Биобезопасность.
Продукция и услуги биотехнологических компаний для конечного пользователя.

БИОВенчур + Старт ап

Венчурные фонды и программы поддержки новых компаний в биотехнологической сфере

Промышленная биотехнология

Оборудование и технологии для организации биотехнологического производства.
Чистые линии: водо- и воздухо- снабжение, проектирование и строительство, хранение и перевозка биотехнологической продукции.

Бионика

Разработка и создание бионических систем, биопртезирование, экзоскелеты.

БИОФранчайзинг

Зона франчайзинговых предложений, связанных с биотехнологиями, лабораториями, системами анализов.

+7 (495) 780-41-09
+7 (495) 722-20-74
119071 Москва, ул.Стасовой, 4
БЦ «Донской Посад», офис С506
www.biomos.ru
info@biomos.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!