

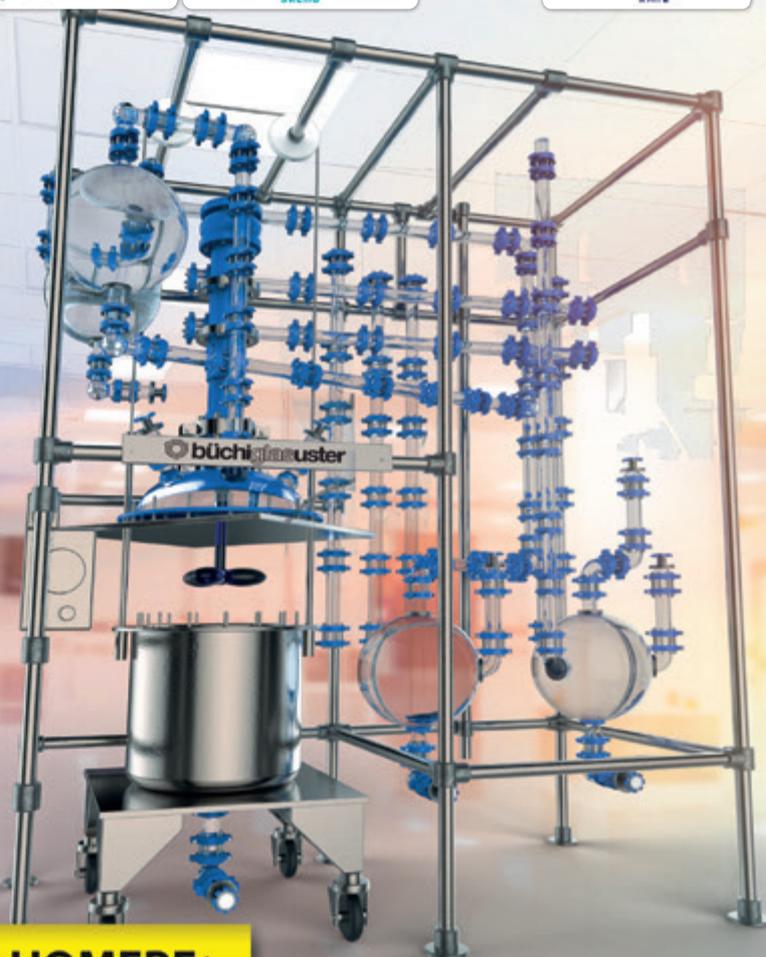
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN2305-2066



СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



Многофункциональные РЕАКТОРЫ СЕРИИ CR

Промышленное
производство
субстанций по
стандартам GMP

büchiglasuster
switzerland Pilot Plant and Reactor Systems

В НОМЕРЕ:

ТЕХНОЛОГИИ ТРЁХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗ
ПРОТИВООЖГОВЫХ
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, В ТОМ
ЧИСЛЕ СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ

КРИТЕРИИ ВЫБОРА СОЕДИНЕНИЙ
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ
АНАЛЬГЕТИКОВ И ДРУГИХ ЛЕКАРСТВ
ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

ЭМБЕНИН – ПЕРСПЕКТИВНОЕ
КАРДИОТОНИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ
ПАТЕНТНОЙ ПРАКТИКИ
В ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА

РЕКОМЕНДАЦИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ
ФАРМАКОПЕИ «РЕГУЛИРОВАНИЕ
УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ»
И ИХ ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ МЕТОДИК
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ

УНИВЕРСАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ

по таблетированию, капсулированию,
сушке и грануляции

PHARMATECH
SEJONG



Установка
псевдооживленного
слоя
сушки-грануляции

D5L



Таблеточные
прессы серии P

P130S



Коатер серии C

C30FC



Коатер

C30JC



Sejong Pharmatech - ваш выбор
в пользу эталонного качества
по привлекательной цене!

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Учредитель
Группа компаний «Фармконтракт»
ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет)
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.
Мустафин Р.И., к.фарм.н.
Павлов В.М., к.фарм.н.
Павлова Л.А., к.фарм.н.
Палева 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)
Оборотова Н.А., проф.,
д.фарм.н.

Русинов В.Л., чл.-корр. РАН, д.х.н.
Белосов М.В., проф., д.фарм.н.
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.
Сысеев Б.Б., доц., д.фарм.н.
Чучалин В.С., д.фарм.н.
Аммур Ю.И., к.биол.н.
Кулинич Ю.И., к.фарм.н.

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

Редактор-корректор:
Троицкая Е.Н.

Адрес редакции

Россия, 115516, Москва,
ул. Промышленная, д. 11/3, оф. 419
+7 (495) 720 42 20

info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии

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

Ответственность за опубликован-
ные материалы несут авторы

Свидетельство о регистрации СМИ:

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

ISSN 2305-2066

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

Founder

«Pharmcontract» Group of Companies
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
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)
Oborotova N.A., prof., PhD

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

Corrector:
Troitskaya E.N.

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



Содержание

Contents

- | | |
|--|--|
| <p style="text-align: center;">От редакции</p> <p style="text-align: center;">Мероприятия</p> <p style="text-align: center;">Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»</p> <p>Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»</p> <p style="text-align: center;">Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В.</p> <p style="text-align: center;">ТЕХНОЛОГИИ ТРЁХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ</p> <p>Секция «Современные ингредиенты лекарственных форм»</p> <p style="text-align: center;">Загорулко Е. Ю., Теслев А. А.</p> <p style="text-align: center;">ВЫБОР ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕЛЯ
ДЛЯ ПРИЁМА ВНУТРЬ «РАЛИТИН»</p> <p>Секция «Технологический контроль лекарственных форм»</p> <p style="text-align: center;">Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В.,
Шитова А. С., Краснюк И. И.</p> <p style="text-align: center;">ИЗУЧЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ</p> <p style="text-align: center;">Дмитриева М. В., Тимофеева Т. А., Оборотова Н. А.,
Краснюк И. И., Степанова О. И.</p> <p style="text-align: center;">ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ
ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ</p> <p>Секция «Лекарственные средства из природного сырья»</p> <p style="text-align: center;">Соловьёва Н. Л., Сокуренок М. С., Зырянов О. А.</p> <p style="text-align: center;">БИОДОСТУПНОСТЬ КУРКУМИНА И МЕТОДЫ
ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ (ОБЗОР)</p> <p style="text-align: center;">Вайнштейн В. А., Каухова И. Е., Амелина П. С.,
Колдашова Ю. А., Минина С. А., Иванова А. В.</p> <p style="text-align: center;">ПОЛИЭКСТРАКЦИЯ ТРАВЫ ЭХИНАЦЕИ СИСТЕМАМИ
ЭКСТРАГЕНТОВ С ВОЗРАСТАЮЩЕЙ ПОЛЯРНОСТЬЮ</p> <p style="text-align: center;">Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А.</p> <p style="text-align: center;">РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ
ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ,
ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ТРАВЫ,
РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО ТРАВЫ</p> <p style="text-align: center;">Мусса Р., Шинева Н. В., Вандышев В. В., Суслина С. Н.</p> <p style="text-align: center;">ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА
И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ
И ТРАВЫ <i>INULA VISCOSA</i> (L.) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ВИДОВ СЫРЬЯ</p> | <p>6 Introduction</p> <p>8 Events</p> <p>«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part</p> <p>«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section</p> <p>10 Blynskaya E. V., Tishkov S. V., Alekseev K. V.
THREE-DIMENSIONAL PRINTING TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF DOSAGE FORMS</p> <p>«Modern ingredients of dosage forms» section</p> <p>20 Zagorulko E. Y., Teslev A. A.
EXCIPIENTS SELECTION AND CHARACTERIZATION FOR «RALITIN» GEL FOR ORAL ADMINISTRATION</p> <p>«Technological control of dosage forms» section</p> <p>30 Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Shitova A. S., Krasnyuk I. I.
THE STUDY OF THE OSMOTIC ACTIVITY OF OPHTHALMIC GELS</p> <p>36 Dmitrieva M. V., Timofeeva T. A., Oborotova N. A., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I.
CHARACTERISTICS AND STABILITY ASSESSMENT OF LIPOSOMAL PREPARATIONS</p> <p>«Drugs from natural raw materials» section</p> <p>46 Soloveva N. L., Sokurenkova M. S., Zyryanov O. A.
BIOAVAILABILITY OF CURCUMIN AND METHODS OF ITS ENHANCING</p> <p>54 Vainshtein V. A., Kauhova I. E., Amelina P. S., Koldashova Yu. A., Minina S. A., Ivanova A. V.
POLYEXTRACTION OF HERBS OF ECHINACEA BY SYSTEMS OF EXTRACENTS WITH RISING POLARITY</p> <p>64 Kauhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A.
THE DEVELOPMENT CONDITIONS FOR EXTRACTION OF THE <i>BIDENS TRIPARTITA</i> L., <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> L. AND <i>AGRIMONIAE UPATORIA</i> L. HERBS</p> <p>68 Mussa R., Sineva N. V., Vandyshev V. V., Suslina S. N.
STUDY OF QUALITY INDICATORS AND TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LEAVES, STEMS AND FLOWERS OF <i>INULA VISCOSA</i> (L.) AS PROMISING RAW MATERIALS</p> |
|--|--|

**Секция «Нанотехнологии в медицине
и фармацевтике»**

Самкова И. А., Мельникова О. А., Петров А. Ю.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗ
ПРОТИВООЖГОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, В ТОМ ЧИСЛЕ
СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ**Раздел «Аналитические методики
и методы контроля»****Секция «Контроль качества
химико-фармацевтических препаратов»**

Дударев В. Г., Кузьминых М. Р., Алексеева Г. М.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ
ХЛОРИРОВАНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ
ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕЛЬМИНТНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВКурсаков С. В., Кузнецова Е. Г., Курылева О. М.,
Саломатина Л. А., Севастьянов В. И.РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Е
В МИКРОЭМУЛЬСИОННЫХ КОМПОЗИЦИЯХ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ

Эпштейн Н. А.

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ
МЕТОДИК: ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО
ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ**Секция «Поиск и разработка новых
лекарственных средств»**Косарева Д. Н., Тарадейко Т. И., Галашева С. Н.,
Ананьева Е. П., Иоэп А. А.АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ
N-АРИЛИДЕНГИДРАЗИДОВ
КАРБОКСИЭТИЛАЛЪГИНОВОЙ КИСЛОТЫСоснов А. В., Семченко Ф. М., Тохмахчи В. Н.,
Соснова А. А., Власов М. И., Радилев А. С.,
Криворотов Д. В.КРИТЕРИИ ВЫБОРА СОЕДИНЕНИЙ
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ
АНАЛЬГЕТИКОВ И ДРУГИХ ЛЕКАРСТВ
ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯПовыдыш М. Н., Лужанин В. Г., Ивкин Д. Ю.,
Белосов М. В., Яковлев Г. П.ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ФИТОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ПРИ
НАРУШЕНИЯХ ЖИРОВОГО И УГЛЕВОДНОГО
ОБМЕНОВ**«Nanotechnology In Medicine And Pharmacy»
section**

74 Samkova I. A., Melnikova O. A., Petrov A. Yu.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND ANALYSIS
OF ANTIFOOD MULTICOMPONENT MEDICINAL
FORMS, INCLUDING CONTAINING
NANOPARTICLES**«Analytical and Quality Control Methods»
part****«Quality Control of Chemical Drug Products»
section**

82 Dudarev V. G., Kuzminykh M. R., Alekseeva G. M.

A COMPARATIVE STUDY OF METHODS
OF THE SALICYLIC ACID CHLORINATION
FOR FURTHER PRODUCTION OF ANTIHELMINTHIC
DRUGS88 Kursakov S. V., Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M.,
Salomatina L. A., Sevastianov V. I.DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD
OF VITAMINE E DETERMINATION IN MICROEMULSION
COMPOSITIONS BY HIGH-EFFECTIVE LIQUID
CHROMATOGRAPHY

96 Epshtein N. A.

VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS:
ROBUSTNESS INVESTIGATION WITH USE
OF EXPERIMENTAL DESIGN**«New Drug Search and Development»
section**110 Kosareva D. N., Taradeyko T. I., Galasheva S. N.,
Ananieva E. P., Iozep A. A.ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF N-ARILIDENHYDRAZIDE
OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID114 Sosnov A. V., Semchenko F. M., Tohmahchi V. N.,
Sosnova A. A., Vlasov M. I., Radilov A. S.,
Krivorotov D. V.SELECTION CRITERIA OF COMPOUNDS
FOR DEVELOPMENT OF HIGH-POTENT ANALGESICS
AND OTHER CNS DRUGS130 Povydysh M. N., Luzhanin V. G., Ivkin D. Yu.,
Belousov M. V., Yakovlev G. P.PROSPECTS OF USING PHYTOTHERAPY
AT DISORDERS OF FAT AND CARBOHYDRATE
METABOLISM



Секция «Контроль качества биопрепаратов»

Уракова И. Н., Крышень К. Л., Пожарицкая О. Н.,
Гаврилин М. В., Шиков А. Н., Макарова М. Н.,
Макаров В. Г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИНСУЛИНОВЫМ
РЕЦЕПТОРОМ РЯДА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
СУБСТАНЦИЙ ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
И ЕГО АНАЛОГОВ МЕТОДОМ
ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО
РЕЗОНАНСА

**Секция «Контроль качества лекарственного
растительного сырья»**

Дьякова Н. А.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И РАДИАЦИОННАЯ
БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО,
СОБРАННОГО В ЦЕНТРАЛЬНОМ
ЧЕРНОЗЕМЬЕ

Нгуен Т. Н., Ожигова М. Г.

ИЗУЧЕНИЕ САПОНИНОВ КОРНЕЙ СОЛОМОЦВЕТА
ДВУЗУБОГО

Тернинко И. И., Нгуен Т. Х. И., Генералова Ю. Э.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИНЕРАЛЬНОГО
СОСТАВА ТРАВЫ КОТОВНИКА КОШАЧЬЕГО
(*NEPETA CATARIA* L.) ИЗ РАЗНЫХ МЕСТ
ПРОИЗРАСТАНИЯ

Комаров Б. А.

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА
ОБЫКНОВЕННОГО

Бровченко Б. В., Ермакова В. А., Кузьменко А. Н.,
Самылина И. А., Краснюк (мл.) И. И.

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ
СОЛОДКИ

**Раздел «Эффективность
и безопасность лекарственных
средств»**

Секция «Доклинические исследования»

Ивкин Д. Ю., Лужанин В. Г., Карпов А. А.,
Минасян С. М., Полещенко Я. И., Мамедов А. Э.,
Повыдыш М. Н., Поройков В. В.,
Наркевич И. А.

ЭМБИНИН – ПЕРСПЕКТИВНОЕ
КАРДИОТОНИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ПРИРОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ

«Biochemicals Quality Control» section

136 Urakova I. N., Kryshen K. L., Pozharitskaya O. N.,
Gavrilin M. V., Shikov A. N., Makarova M. N.,
Makarov V. G.

COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION
OF SOME DOMESTIC HUMAN INSULIN
SUBSTANCES AND ITS ANALOGUES
WITH INSULIN RECEPTOR BY METHOD
OF SURFACE PLASMON
RESONANCE

**«Quality Control of Herbal Drug Products»
section**

144 Dyakova N. A.

EFFICIENCY AND RADIATIVE SAFETY
OF MEDICINAL VEGETABLE RAW
MATERIALS OF THE PLANTAIN BIG,
COLLECTED IN THE CENTRAL BLACK
EARTH

148 Nguyen T. N., Ozhigova M. G.

STUDY OF SAPONINS IN ROOTS OF ACHYRANTHES
BIDENTATA BLUME

152 Terninko I. I., Nguyen T. H. Y., Generalova Yu. E.

COMPARATIVE STUDY OF MINERAL COMPOSITION
OF CATNIP HERB (*NEPETA CATARIA* L.)
FROM DIFFERENT REGIONS

158 Komarov B. A.

THE ELEMENTAL COMPOSITION OF YARROW

162 Brovchenko B. V., Ermakova V. A., Kuzmenko A. N.,
Samylina I. A., Krasnyuk (Jr.) I. I.

OPTIMIZATION OF HPLC METHODS
FOR QUANTITATIVE DETERMINATION
OF GLYCYRRHIZIC ACID IN LICORICE
ROOTS

**«Drug Products Efficacy and Safety»
part**

«Preclinical Trials» section

166 Ivkin D. Yu., Luzhanin V. G., Karpov A. A.,
Minasyan S. M., Poleshchenko Ya. I., Mamedov A. E.,
Povydysh M. N., Poroykov V. V.,
Narkevich I. A.

EMBININ IS A PERSPECTIVE CARDIOTONIC MEAN
FOR NATURAL ORIGIN

Секция «Клинические исследования»

Деева Э. Г., Шевчик Ю. И., Шалджан А. А.,
Загородникова К. А., Тумашов А. А., Баклыков А. В.,
Котовская С. К., Чупахин О. Н., Чарушин В. Н.,
Русинов В. Л., Копчук Д. С.

НОВЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ
«ТРИАЗИД». РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ

«Clinical Trials» section

172 Deyeva E. G., Shevchik Yu. I., Shaldghan A. A.,
Zagorodnikova K. A., Tumashov A. A., Baklykov A. V.,
Chupahin O. N., Charushin V. N., Rusinov V. L.,
Kopchuk D. S.

NEW ANTIVIRAL DRUG TRIAZID. RESULTS OF FIRST
PHASE OF CLINICAL TRIAL

Раздел «Регуляторные вопросы»

Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И.

РЕКОМЕНДАЦИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ
ФАРМАКОПЕИ «РЕГУЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ
ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ» И ИХ ОГРАНИЧЕНИЯ
ДЛЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРИМЕСЕЙ

Громакова А. И., Король Е. В., Семкина О. А.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТЕНТНОЙ
ПРАКТИКИ В ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА

«Regulatory Issues» part

182 Epshtein N. A., Sevastianova V. L., Koroleva A. I.

RECOMMENDATIONS OF THE EUROPEAN
PHARMACOPOEIA «ADJUSTMENT
OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS»
AND THEIR RESTRICTIONS FOR THE METHODS
OF IMPURITIES DETERMINATION

190 Gromakova A. I., Korol E. V., Semkina O. A.

MODERN ASPECTS OF PATENT PRACTICE
IN THE ACTIVITY OF THE SCIENTIFIC RESEARCH
INSTITUTE

Секция «История фармации»

Гузев К. С.

НЕЗАМЕНИМЫЕ ПОМОЩНИКИ И ПАРТНЁРЫ
РОССИЙСКИХ ЕСТЕСТВОИСПЫТАТЕЛЕЙ НА РУБЕЖЕ
XIX–XX ВВ.

«History of Pharmacy» section

196 Guzev K. S.

INDEPENDENT ASSISTANTS AND PARTNERS
OF RUSSIAN NATURAL RESEARCHERS ON THE ABROAD
OF THE XIX–XX CENTURY

Рецензии на монографии 204 Reviews of the monograph**Публикации партнеров 206 Partner Publications**



Уважаемые читатели, авторы и партнеры!

Вы держите очередной номер научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», входящего в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, включённых Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук. В этом номере еще больше научных статей о новых разработках в области лекарственных средств. Конечно же, здесь вы найдете информацию об актуальнейших изменениях в области законодательства и регулирования рынка производства, дистрибьюции и обращения лекарственных средств, рекомендации по проведению различных видов исследований и контролю качества производимых лекарственных форм: рекомендации Европейской фармакопеи «регулирование условий хроматографирования» и их ограничения для методик определения примесей; практические аспекты патентной практики в деятельности научно-исследовательского института.

Данный номер содержит обширный материал по фармацевтической технологии и нанотехнологиям: от этапа создания новых препаратов до их технологического контроля.

В отчете о прошедшей летом международной выставке упаковочного оборудования «RosUpack» вы сможете познакомиться с различными вариантами данного типа систем, в том числе, и с теми, которые позволят оперативно внедрить на вашем предприятии систему маркировки лекарственных средств, соответствующую международным стандартам.

Материалы из исторического экскурса становления фармации как науки позволят узнать об особенностях работы российских создателей материально-технической базы данного направления.

Надеемся, что представленные материалы будут полезны в вашей работе.

*С уважением, Редакция журнала
«Разработка и регистрация
лекарственных средств»*

ТРЕТЬЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «РОССИЯ И МИР. УПРАВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛОМ РОСТА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА»



**27-29 августа
2018
Казань,
Татарстан**

- Ожидается более 1000 участников
- Более 20 делегаций из разных стран мира
- Эксперты в области надлежащих практик мирового уровня
- Подписание глобальных отраслевых соглашений
- Встреча инспекторов стран ЕАЭС
- Конференция по инжинирингу Евразийского отделения ISPE
- Глобальные тренды в области GMP, GDP, GEP
- Обсуждения, дискуссии, практические сессии

Технический оператор:
Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
+7 (495) 120-53-33, info@sgr.com.ru, www.sgr.com.ru

Сайт мероприятия – www.gosgmp.ru

УЧАСТИЕ БЕСПЛАТНОЕ

Генеральный партнер



Стратегические партнеры



ГЕДЕОН РИХТЕР



ТАТХИМФАРМПРЕПАРАТЫ

«ROSUPACK»: ЧТО НОВОГО В ОБЛАСТИ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ УПАКОВКИ ПРЕДСТАВЛЯЛИ В КОНЦЕ ИЮНЯ

26–29 июня в «Крокус Экспо» прошла 23-я Международная выставка упаковочной индустрии – «RosUpack», которая, по сути, завершила сезон зима-весна 2018 года конгрессно-выставочной индустрии. В этом году на площадке выставки были собраны самые разнообразные решения по упаковке всех типов продуктов, интересные для сегмента b2b. Первые дни выставки показали спрос на упаковку, и прежде всего на оборудование для групповой и индивидуальной упаковки, линии розлива различных продуктов химической промышленности с последующей укупоркой и этикетировкой, а также на машины для сериализации и агрегации.



Июнь уже давно у всех производителей самого широкого спектра продукции неразрывно ассоциируется с выставкой «RosUpack», на площадке которой можно подобрать не только фасовочное, укупорочное и этикетировочное оборудование, но и проработать полноценную производственную линию, от входного контроля сырья до автоматизации системы отбраковки дефектного контейнера и нанесения одной или сразу нескольких самоклеящихся этикеток. Каждый год производители и поставщики оборудования стараются чем-то удивить гостей выставки, представить новые бренды или модели упаковочных машин. Что же мы видели в этом году?

Традиционно на стенде крупнейшего национального дистрибьютора технологического и лабораторного оборудования ГК «Фармконтракт» была представлена линия розлива и укупорки **Spectrum**, объединенная с этикетировочной системой **Proxima**. Данная система позволяет осуществлять розлив во флаконы объемом до 250 мл с производительностью 3 тыс. бутылок в час, а за счет этикетировочной установки **Proxima** происходит нанесение 2 видов самоклеящихся этикеток. Стоит отметить, что в линии IMACO также имеются автоматические линейные одноголовочные укупорочные машины для укупорки больших контейнеров серии **Hermes** и даже весовые

системы розлива, обеспечивающие розлив еврокубов, канистр и баррелей, серии **Gemini!** Также в портфеле чешской компании можно найти и тубонаполнительные системы **Geus** и **Sigma** для розлива и укупорки металлических или пластиковых и ламинатных туб.

Были на «RosUpack» и решения по востребованной фармрынком сериализации и агрегации. Также для этой отрасли можно было найти решения по упаковке продуктов для перорального применения в блистеры на базе итальянской компании **O.M.A.R.** Кстати, в портфеле итальянцев есть и решения по выпуску блистеров различной длины для упаковки монодоз, а также твердых продуктов перорального применения и даже медицинских изделий (шприцев, ампул, флаконов). Стоит отметить, что у итальянцев есть не только решения для массовых промышленных производств, но и лабораторные системы. Например, блистерная машина **Fantasy** идеально подойдет для R&D-процессов, клинических исследований и тестов на стабильность, которые позволяют выпускать блистеры из предварительно вырезанной фольги. В семействе лабораторных блистерных машин **O.M.A.R.** есть даже самая маленькая машинка на всем рынке – **Twin Pack**, формирующая, запаивающая и обрезающая блистеры из предварительно обрезанной фольги.



Поскольку у **O.M.A.R.** накоплен колоссальный опыт в области упаковки продукции в блистеры, они представляют и машины для изъятия уже упакованного продукта. Здесь можно подобрать как деблестерные машины для изъятия как капсул, так и таблеток различных форм и даже мягких желатиновых капсул и драже.

Чем же завершился сезон и что показали производители и дистрибьюторы

С каждой выставкой становится все очевиднее, что в российской выставочной индустрии утверждаются европейские тенденции: оборудования в выставочных павильонах становится все меньше, по большей части стенды участников – это переговорные зоны, куда приходят постоянные клиенты для обсуждения и согласования особенностей чертежей будущих линий упаковки.

Поскольку самым популярным продуктом для упаковки в этом году стали косметические средства и бытовая химия, холдинг **ГК «Фармконтракт»** представил решения по упаковке таких милых дамских вещей, как губная помада и пудра, на базе оборудования корейского производства **Leidex**.

В общем, каждый мог найти специфическое решение для своего типа продукта.

Так как гостей выставки всегда привлекает деловая программа, стоит пару слов сказать о ней. В этом году уклон организаторы «RosUpack» сделали в сторону непосредственно самой упаковки, ее видов и качества как конкурентного преимущества. Потому гостей «RosUpack» можно было чаще увидеть на стендах тех экспонентов, которые привезли интересные линии и упаковочные машины.

Если в день открытия гости выставки интересовались преимущественно упаковкой косметики и бытовой химии, то самым популярным вопросом второго дня стала подготовка к переходу до 2019 или 2020 года на обязательную маркировку лекарственных средств.

Главный вопрос 2-го дня «RosUpack»: как быстро и бюджетно подготовиться к обязательной маркировке?

Второй день выставки «RosUpack» продемонстрировал тенденцию российской фармпромышленности к вступлению в активную фазу подготовки к обязательной маркировке. Если раньше отечественные фармзаводы занимали скорее выжидательную позицию: сдвинут или не сдвинут сроки, будет ли переходный

период для подготовки к обязательной маркировке лекарственных средств, то сегодня фармпромышленность активно ищет поставщиков систем Track&Trace. И пришли они в поисках решений по сериализации и агрегации на профильное мероприятие.

В то же время в рамках выставочной экспозиции «RosUpack» предложить доступное и одновременно идеальное по качеству и международным стандартам решение для фармацевтической сериализации упаковки могут, пожалуй, только 3–4 компании. Самый обширный модельный ряд и широкий ценовой диапазон можно было увидеть на стенде крупнейшего национального дистрибьютора технологического и лабораторного оборудования **ГК «Фармконтракт»**. Здесь были представлены немецкие установки сериализации **Visiopharm**, позволяющие проводить сериализацию как отдельной пачки, так и коробка, и даже целой паллеты! Более того, эта система обеспечивает процесс идентификации, фиксации и обмена данными по стандарту GS1. В результате каждый потребитель имеет доступ к информации о передвижении приобретаемого лекарственного средства до аптечной полки

Что еще было на «RosUpack»

Помимо запросов на системы сериализации для фармпромышленности, экспоненты «RosUpack» готовы были удовлетворить запросы на целые технологические линии, включающие розлив, укупорку и этикетировку. В частности, весовая система розлива еврокуба от **Imaco Group** может осуществлять розлив как над уровнем продукта, так и ниже или чуть выше уровня продукта, а ПЛК с цветным сенсорным экраном обеспечивает хранение параметров розлива. Данная система может быть дополнена и этикетировочной машиной **Proxima**, позволяющей наносить 1 и более самоклеющихся этикеток на сложные поверхности. Для нанесения этикеток на цилиндрические поверхности машину просто доукомплектовывают допстройками DRP.

Также на выставке «RosUpack» можно было найти и достаточно бюджетные (что несколько не сказывается на качестве) полнофункциональные этикетировочные машины корейского производства **Sky**. Например, машины бокового типа этого производителя позволяют отслеживать сам процесс маркировки и осуществлять контроль за ним, проводить автоматическую отбраковку, включая проверку этикеток. Отличительным элементом такой установки является возможность нанесения маркировки на нижнюю часть флакона. Причем флаконы могут иметь самую разнообразную форму: круглую, квадратную, прямоугольную и проч.



УДК 615.45

ТЕХНОЛОГИИ ТРЁХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Е. В. Блынская¹, С. В. Тишков^{1*}, К. В. Алексеев²

Резюме. Развитие персонализированной медицины требует новых подходов к созданию лекарственных форм (ЛФ), одним из таких подходов является быстрое прототипирование, или, по-другому, трёхмерная печать таблеток, пластырей и других ЛФ. Данная технология позволяет реализовывать принцип индивидуального дозирования, точного пространственного расположения фармацевтической субстанции (ФС), возможность использования различных геометрических форм таблеток для корректирования скорости высвобождения в зависимости от потребности пациента, к тому же при создании ЛФ по представленной технологии имеется возможность создавать и быстро корректировать профиль высвобождения в зависимости от требований пациента. Особым толчком к развитию данной технологии послужило признание масштабируемости быстрого прототипирования и выпуск в 2016 году в США с одобрения FDA (Food and Drug Administration) напечатанной с использованием 3D-технологии ородиспергируемой таблетки Spritam® (levetiracetam). В данном обзоре представлены методы производства ЛФ при помощи трёхмерной печати, такие как процесс TheriForm®, стереолитография, экструзионная печать, непрерывная струйная печать, печать на основе пропитанной нити, печать путём микровпрыскивания и т.д., дана классификация видов трёхмерной печати и особенностей применения каждого типа печати и оборудования, на котором происходит основной технологический процесс. Для наглядности процессов приведены составы и используемые вспомогательные вещества (ВВ), например биоразлагаемые полимеры, такие как ПЛА, ПЛГА и др., составы «чернил» и порошковых подложек, необходимых для каждого вида процесса, а также экспериментальные данные, полученные из литературных источников, кривые высвобождения и технологические свойства модельных образцов. Продемонстрированы возможности, которые открывает трёхмерная печать лекарственных средств (ЛС) перед исследователями и разработчиками ЛФ, в частности быстрая разработка и получение комбинаций нескольких ФС с пульсирующим, контролируемым, немедленным или другим видом последовательного высвобождения представленных ФС в одной ЛФ. Проведена оценка конструктивных особенностей, преимуществ, недостатков и показаны основные составляющие детали оборудования для трёхмерной печати ЛФ; основное внимание уделено таким элементам, как печатающие головки, так как именно от их скорости, механизма действий и устройства зависит тип быстрого прототипирования и свойства получаемой ЛФ. Сделаны выводы о перспективах данного направления в целом и каждой технологии в отдельности, оценены преимущества и недостатки представленных методов производства ЛФ.

Ключевые слова: 3D-печать лекарственных форм, быстрое прототипирование, аддитивные технологии, TheriForm™, контролируемое высвобождение, персонализированная медицина, стереолитография.

THREE-DIMENSIONAL PRINTING TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF DOSAGE FORMS

E. V. Blynskaya¹, S. V. Tishkov^{1*}, K. V. Alekseev²

Abstract. The development of personalized medicine requires new approaches to the development of dosage forms (DF), one such approach is rapid prototyping or in a different way the three-dimensional printing of tablets, plasters and other DF. Since the principle of individual dosing, the exact spatial arrangement of the pharmaceutical substance (PS), the possibility of using various geometric tablet forms to adjust the release rate, depending on the patient's need, is also possible in this approach, moreover, when creating a DF for the presented technology, it is possible to create and quickly adjust the release profile according to the patient's requirements. A special impetus to the development of this technology was the recognition of the scalability of rapid prototyping and the release in 2016 in the US: with the approval of the FDA (Food and Drug Administration) 3D-printed orodispersible tablet Spritam® (levetiracetam). In this review we present methods of production of DF by the method of three-dimensional printing, such as the TheriForm® process, stereolithography, extrusion, continuous inkjet printing, impregnated thread printing, microprojection, etc., classification of 3D printing types and features of each type of printing and equipment, on which the main technological process is produced. For the sake of clarity of the processes, the compositions and auxiliary substances used (AS), for example biodegradable polymers such as PLA, PLGA, etc., compositions of «ink» and powder substrates required for each type of process are given, as well as experimental data obtained from literature sources, curves release and technological properties of model samples. The possibilities demonstrated by the 3D printing of drugs to researchers and developers of the DF, in particular the rapid development and production of combinations of several PS with pulsatile, controlled, immediate or any other type of sequential release of the present FS in one DF are demonstrated. The evaluation of design features, advantages and disadvantages is carried out and the main components of the equipment for 3D DF printing are shown, the main attention is paid to such elements as printheads. It is their speed, mechanism of action and device that determines the type of rapid prototyping and the properties of the received DF. Conclusions about the prospects of this direction, in general, and of each technology separately, are evaluated, the advantages and disadvantages of the presented methods of DF production are estimated.

Keywords: 3D-printing of medicinal forms, rapid prototyping, additive technologies, TheriForm™, controlled release, personalized medicine, stereolithography.

1 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова», 125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

2 – Частное учреждение образовательная организация высшего образования «Медицинский университет «РЕАВИЗ», 107564, Россия, г. Москва, ул. Краснобогатырская, д. 2

1 – «Scientific Research Institute of Pharmacology named after. V. V. Zakusov», 8, Baltic str., Moscow, 125315, Russia

2 – Medical University «REAVIZ», 2, Krasnobogatyrskaya str., Moscow, 107564, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Sergey-tishkov@ya.ru

ВВЕДЕНИЕ

Трёхмерная печать (Three-dimensional printing, 3DP) представляет собой форму аддитивного (путем послойного наращивания сырья) производства, в котором структура создается путем осаждения или связывания материалов в последовательных слоях для создания 3D-объекта [5, 4]. Аддитивное производство является подклассом быстрого прототипирования, которое включает в себя методы быстрого изготовления моделей и прототипов, однако в настоящее время оно считается масштабируемым производственным процессом [14, 327]. Первый метод быстрого прототипирования стал доступен в начале 1990-х годов в Массачусетском технологическом институте, а выданная в Therics, Inc. (Принстон, Нью-Джерси) в 1994 году лицензия охватывает использование 3DP для производства различных продуктов, включая лекарственные препараты (ЛП). Применение этих технологий в области доставки лекарственных средств (ЛС) активно исследовалось и в 2016 году реализовано в США: с одобрения FDA с использованием 3DP напечатана ородиспергируемая таблетка Spritam® (levetiracetam), что в еще большей степени продемонстрировало возможности 3D-печати для производства сложных и индивидуальных лекарственных форм (ЛФ) [30, 3670; 29, 16; 20, 29].

Преимущества аддитивных методов в разработке ЛФ заключаются в способности точно контролировать пространственное распределение фармацевтических субстанций (ФС) в ЛФ, создавать сложные геометрии, осаждать очень малые количества ФС, уменьшать количество отходов и ускорять изготовление различных композиций для проведения скрининговых исследований или подготовки индивидуализированных ЛП [29, 16; 20, 29; 3, 571; 17, 8]. Производственные достоинства, связанные с печатью ЛП, состоят в уходе от традиционно сложных, медленных и дорогостоящих цепочек производства и способствуют получению более персонализированных ЛФ без необходимости высокого объема производства [9, 555].

ТЕХНОЛОГИИ 3D-ПЕЧАТИ

За последние 15 лет в индустрию быстрого прототипирования было внедрено большое количество технологий 3D-печати (рисунок 1).

Несмотря на то что были разработаны другие конкурентные процессы, такие как лазерные печатающие системы или системы осаждения на основе форсунок, печатающие струйные системы по-прежнему остаются наиболее часто используемыми методами трёхмерной печати (рисунок 1).

Системы печати на основе струйных систем

Струйная печать является общим термином для описания систем, в которых реализовано цифровое управление формированием и размещением небольших капель жидкости на подложке с использованием



Рисунок 1. Классификация методов трёхмерной печати [4, 9, 17, 22]

устройства, генерирующего шаблон. В основном существуют два метода 3D-печати на основе струйных принтеров: непрерывная струйная печать (continuous inkjet printing, CIJ) и струйная печать по требованию (drop-on-demand, DoD). Оба типа принтеров характеризуются наличием головки принтера (термической или пьезоэлектрической) и необходимостью контролировать скорость образования капель и вязкость жидкости. Печатающая головка DoD обычно содержит несколько форсунок (100–1000). По сравнению с термальными печатающими головками, применение которых ограничено летучими жидкостями, пьезоэлектрические печатающие головки могут использоваться с большим количеством «чернил» [9, 556]. Термальные печатающие головки используют резистивные элементы для создания тока. Когда ток течет через резистор, появляется электрическое сопротивление в этих элементах, температура поднимается до 300 °С, что приводит к испарению небольшого объема жидкости. Получающийся пузырь расширяется и передает энергию, необходимую для извлечения капли (рисунок 2а). В пьезоэлектрическом методе форма пьезоэлектрического кристалла быстро изменяется (рисунок 2б), что приводит к резкому изменению объема и генерации акустического импульса, воздействие которого на текучую среду увеличивает скорость сдвига до 105 с⁻¹, создавая достаточное давление для извлечения капли [31, 197]. Обе печатающие головки могут создавать капли диаметром от 10 до 50 мкм, что соответствует объему от 1 до 70 пиколитров [9, 554]. Считается, что пьезоэлектрическая печать позволяет лучше контролировать образование капель и протекает без выделения тепла, что делает этот способ печати более предпочтительным для использования при разработке ЛФ [29, 16; 19, 34].

Если головка принтера выталкивает сформированные капли друг на друга для получения твердого слоя выстраиваемого материала, метод DoD называется «капельное осаждение», если она выталкивает кап-

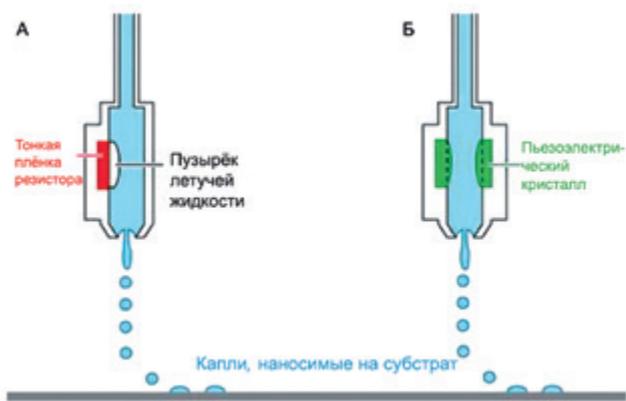


Рисунок 2. Схема печати DOD с (а) термическим и (б) пьезоэлектрическим приведением в действие [9, 555]

ли на твердый материал, метод называется «осаждение на твердой основе» [8, 138].

В то время как методы капельного осаждения кажутся довольно трудными для реализации, осаждение на твердую основу (например, на порошковый слой) представляется подходящим методом для печати широкого спектра ФС [26, 3389]. В трехмерной печати нанесение капель на твердую основу предпочтительно называют осаждением на порошок или осаждением на слой, так как капли связующего склеивают порошковый материал [8, 138].

Нанесение капель на порошок: процесс TheriForm™

Процесс TheriForm™ является лицензированным приложением оригинального 3DP-патента [25], выпущенного в Массачусетском технологическом институте в 1993 году. Он заключается в распределении жидкости в тонком слое порошка посредством печатающей головки с управляемым движением. Каждый напечатанный слой представляет собой двумерный срез ЛФ, которую нужно изготовить (рисунок 3). Порошковый слой наносится и равномерно распределяется после каждого прохода печати, затем процесс повторяется, формируя новый двумерный слой, до тех пор, пока ЛФ не будет полностью выстроена. Процесс позволяет разместить одну или несколько ФС в вы-

бранных местах внутри ЛФ вместе с другими вспомогательными веществами (ВВ), которые контролируют скорость высвобождения ФС. С помощью TheriForm™ создаются ЛФ с уникальными и сложными профилями высвобождения, которые соответствуют наиболее приемлемому режиму дозирования.

Более ранние публикации показали, что процесс TheriForm® обладает высокой точностью размещения капелек жидкости, дозирования ФС и способностью конструировать пероральные ЛФ со сложными профилями высвобождения [29, 7]. Сложные профили высвобождения обычно достигаются путем размещения ФС в различных матрицах для контроля высвобождения. Эти матрицы часто являются отделениями в ЛФ, окруженной стенками из контролирующего высвобождение материала. Отделения могут быть довольно маленькими, от 500 нанометров до нескольких нанометров.

Изменения свойств ЛФ достигают путем изменения нескольких рабочих параметров. Толщина слоя и расстояние между линиями печати оптимизированы для обеспечения адгезии между линиями и слоями. Скорость потока жидкого связующего и скорость перемещения закреплённой оси печатающей головки определяют количество связующего, нанесенного на единицу длины линии. Это позволяет получить таблетки с более высокой прочностью и меньшей истираемостью. Осаждение больших количеств связующего может вызвать вытекание связующего, что приводит к неравномерности связывания и отделению поверхности.

В первом типе таблеток «рапид – ретард» как основание, так и верхняя часть ЛФ образованы шестью плацебо-слоями (200 мкм каждый) из сополимера аммоний-метакриловой кислоты типа В (Eudragit® RLPO). Известно, что Eudragit® RL является водонерастворимым, но проницаемым полимером независимо от pH. Центр содержит восемь слоев Eudragit® RLPO, пропитанных малеатом хлорфенирамина. Второй слой таблетки сконструирован с 200-микронными слоями катионного сополимера метакрилового эфира Eudragit® E100, из которого состоят стенки ЛФ. Eudragit® E100 характеризуется pH-зависимой

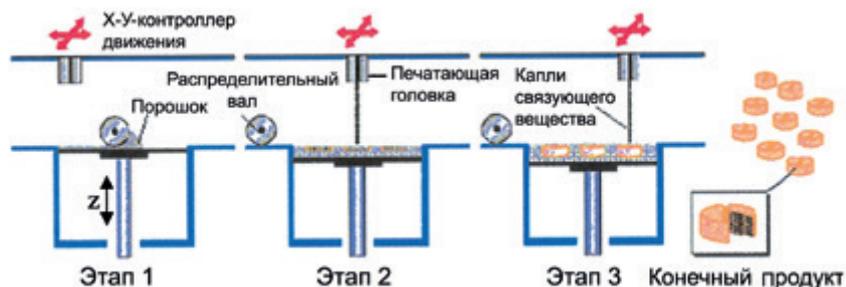
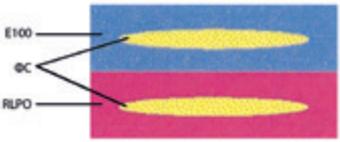
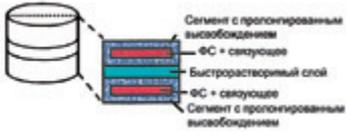
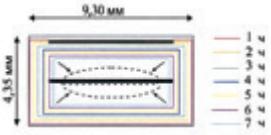
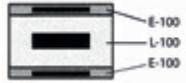


Рисунок 3. Схема процесса создания ЛФ по технологии TheriForm® [17, 4]

Таблица 1.

ЛФ, изготовленные по технологии TheriForm® [29, 16]

Модификации высвобождения и технологии 3D таблеток	Характеристика	Схематическое изображение лекарственных форм, полученных по технологии TheriForm®
Таблетки «рапид – ретард»	Немедленное высвобождение в желудке и пролонгированное диффузионное высвобождение в кишечнике	
Разделяющиеся таблетки	Быстрорастворимый слой окружён двумя сегментами с пролонгированным высвобождением	
Кишечное двойное пульсирующее высвобождение	Полимер является кишечнорастворимым, и растворение идёт за счёт эрозии. ФС печатается в две секции для двойного высвобождения в кишечнике	 На рисунке схематично представлена таблетка в разрезе: стрелки в центральной части обозначают направление растворения таблетки; пунктирные линии отмечают форму постепенного растворения таблетки; «чёрные» линии иллюстрируют расположение ФС в таблетке; «цветные» линии демонстрируют послойное растворение таблетки.
Двойная пульсация	ФС содержится в двух частях таблетки с противоположной pH-растворимостью. Двойное высвобождение в желудочной и кишечной жидкости	

растворимостью. Он растворяется при pH ниже 5,0 и проникает при pH выше этого значения. Затем 30% мас./мас. водный раствор малеата хлорфенирамина вводится в круглую область в центре устройства (таблица 1). ЛФ сушили в течение ночи в сушилке с током азота, а затем помещали в вакуумную печь на 48 часов перед использованием.

Профили растворения такой системы показали увеличение высвобождения в течение первых полутора часов из-за растворения Eudragit® E 100 с последующим 6-часовым пролонгированным высвобождением за счет диффузии ФС через нерастворимую область.

Разделяющиеся таблетки состоят из двух секций с замедленным высвобождением, изолированных быстро растворяющимся слоем (таблица 1). Блоки, содержащие ЛС, изготавливаются путем печати ацетонного раствора с Eudragit® RLPO. В пропечатанные секции печатается метанольный раствор с диклофенаком и поливинилпирролидоном-K25 (ПВП-K25), затем снова ацетоновый раствор с Eudragit для закрытия секции, после чего быстрорастворимый слой (водный раствор ПВП-K25). Затем формируют ещё одну секцию в том же порядке, что и ранее. Через 30–45 минут в моделируемой желудочной жидкости центральный слой растворяется, высвобождая обе субъединицы с замедленным высвобождением, содержащие ФС.

Подобные печатные ЛФ могут выделять не только две, но и несколько активных единиц в зависимости от толщины слоев. В настоящее время однократное введение нескольких препаратов, характеризующихся различными профилями высвобождения, может выполняться только с использованием нескольких систем, таких как микросферы или гранулы.

Для получения энтеросолюбильной системы с двойным пульсирующим высвобождением в качестве связующих «чернил» использовали этанольный раствор сополимера анионного метакрилового эфира Eudragit® L-100 [28, 135], тогда как порошкообразный слой состоял из микрокристаллической целлюлозы, высушенной распылением лактозы и Eudragit® L-100 (таблица 1). Он был сконструирован с использованием одной непрерывной фазы энтеросолюбильных ВВ, в которую диклофенак был напечатан в двух разделенных областях [4]. Интересно, что после задержки высвобождения в течение одного часа (вероятно, из-за постепенного растворения Eudragit® L в водной среде при pH 7,5) профиль растворения показал первый выход ФС в интервале от 1 до 4 часов. Вторая фаза высвобождения наблюдалась между 8 и 13 часами испытаний. Описанная методика показала возможность создания ЛФ с пульсирующим высвобождением, что создает предпосылки для применения аналогичной

технологии при получении системы пульсирующей доставки нескольких ФС, имитирующей циркадные циклы.

К тому же разработчики продемонстрировали, что ЗДР позволяет изготавливать таблетки с двойным пульсирующим высвобождением с двумя разными сополимерами (таблица 1) [30, 3667]. На основе предыдущих разработок кишечнорастворимая секция была составлена из диклофенака и Eudragit® L. Эта центральная матрица была покрыта как снизу, так и сверху слоями, содержащими те же ФС и Eudragit® E. Было показано, что диклофенак, диспергированный в желудочнорастворимом сополимере, быстро высвобождался в кислых средах. Затем, когда таблетки переносятся в смоделированную кишечную жидкость, они демонстрируют замедленное высвобождение из-за прогрессирующей эрозии Eudragit® L.

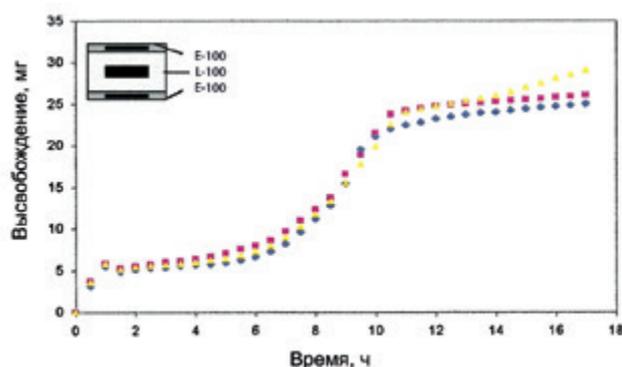


Рисунок 4. Схема структуры и профилей растворения для ЛФ диклофенака натрия с отсроченным высвобождением [29, 14]

Перспективой развития вышеописанного подхода может стать разработка системы доставки с двойным высвобождением и двумя различными препаратами. Например, мизопропрост, синтетическое производное простагландина E1, используемое для профилактики язв, вызванных терапией нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС) [7, 773], – может быть включен в матрицу Eudragit® E, тогда как НПВС может содержаться в кишечнорастворимом сегменте.

Для систем с контролируемым высвобождением важно добиться протекания процесса с постоянной скоростью, не зависящей от градиента концентрации ЛС. Желательно, чтобы ЛП с нулевым или постоянным высвобождением уменьшал колебания концентрации ЛС в крови [24, 30]. В настоящее время разработка ЛФ с замедленным высвобождением нулевого порядка по-прежнему остается сложной задачей для провизоров-технологов.

Традиционными подходами к обеспечению высвобождения нулевого порядка в таблетированных

ЛФ являются: использование ВВ, характеризующихся различными физико-химическими свойствами, применение ЛФ со специальной геометрией или несколькими покрытиями или разработка структуры осмотического насоса. Однако эти подходы часто сопряжены с подключением относительно сложных процедур и не обладают возможностью регулировать параметры высвобождения, применяя один технологический процесс получения ЛФ для достижения практических целей. Поэтому ЗДР, похоже, способна устранить проблемы, связанные с разработкой и производством ЛФ с контролируемым высвобождением.

Помимо традиционной идеи системы с контролируемым высвобождением, которая обычно означает поддержание и/или нацеливание на выпуск препарата, состоящего из нескольких субъединиц, процесс TheriForm™ также позволяет разрабатывать концепцию другого типа, представляющую собой быстро-диспергируемую систему доставки лекарств. Этот процесс может применяться как для контролируемого высвобождения ЛС при точном геометрически выверенном распределении ФС в таблетке, так и при создании таблеток, диспергируемых в полости рта, где не имеет значения распределение ФС.

К тому же процесс TheriForm™ позволяет создавать таблетки, диспергирующиеся в ротовой полости, или, по-другому, орально-диспергирующиеся таблетки (ОДТ). Обычные способы изготовления таких ЛФ включают лиофилизацию, распылительную сушку, сублимацию, формование или уплотнение. Ограничение применения этих подходов заключается в их низкой производительности при получении таблеток достаточной твердости и прочности, обладающих высокой диспергирующей способностью [4, 119]. Для достижения этой цели ЗДР предлагает подходящую альтернативу для модуляции пористости, чтобы обеспечить быструю абсорбцию воды при сохранении высокой механической прочности.

Lee с соавторами разработали ЛФ TheriFlash™, сконструированную в виде структуры «ядро – оболочка», где плацебо-оболочка, изготовленная из маннита и либо мальтита, мальтодекстрина, либо ПВП-K25, окружает слой порошка с ФС [18, 45]. Этот слой состоит из подобной порошкообразной смеси, в которой частицы связаны водным буферным жидким связующим, содержащим каптоприл и ПВП-K25. Структура внешнего слоя ЛФ TeriFash™ представляет собой сплошной образец, средний участок ОДТ неоднородный и содержит свободные порошки ФС. Обе системы характеризовались средним временем распадаемости менее 60 секунд, что соответствует общепринятым стандартам для ОДТ.

Как видно, процесс TheriForm™ обеспечивает простой, модульный и повторяемый процесс, который

превосходит обычные методы создания широкого спектра систем доставки лекарств. Однако этот метод подходит для производства крупных угловатых ЛФ, не обеспечивающих удобства при пероральном применении. До сих пор преимущества использования метода TheriForm™ для производства пероральных ЛФ не были достаточно очевидными для фармацевтических компаний. Тем не менее коммерциализация Spritam® может иметь неоспоримые достоинства, чтобы проложить путь маркетингу потенциальных будущих печатных систем пероральной доставки ЛС.

Трёхмерная печать капельным осаждением

Капельное осаждение (drop-on-drop) – это метод прямой струйной печати, способный создавать микроскопические системы доставки лекарств с пространственной конфигурацией и относительно высокими дозировками ФС. Elele с соавторами использовали этот метод для печати капель ибупрофена с полиэтиленгликолем (ПЭГ), которые можно было впитать в пористую подложку из гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) [10, 2526]. Хотя наложение таких единиц может создавать трехмерную ЛФ, субстрат целлюлозного производного ГПМЦ получают путем сублимационной сушки, и поэтому окончательная структура полностью не продуцируется в 3DP.

Также использование ПЛГА [поли(лакто-согликолевой кислоты)] и ПЛА (поли-L-лактида) позволяет применять технологию струйной печати с капельным осаждением для создания ЛФ [16, 6953]. В этом случае «чернила» и структурная подложка являются одним и тем же материалом. Принцип заключается в том, чтобы напечатать первую каплю, содержащую как ФС, так и полимер. Затем нагревательный элемент вызывает испарение растворителя и, таким образом, затвердевание полимера, что позволяет осажать вторую каплю. Многократные перекрытия позволяют создавать трехмерные структуры высоко разрешения.

Несмотря на то что технология струйной печати на основе капельного осаждения описывается как альтернативный способ получения ЛФ, важно иметь в виду влияние как физико-химических, так и терапевтических свойств введенного препарата при включении в структуру ФС и возможные проблемы стабильности на этапе сушки. Более того, использование летучего растворителя, который должен растворять как ЛС, так и полимер, резко ограничивает применение этой методики. Отсутствие твердой подложки приводит к необходимости получения подходящих по вязкости «чернил», чтобы избежать засорения форсунок и утечки жидкости. Таким образом, капельное осаждение имеет аналогичные ограничения, как и другие традиционные способы изготовления ЛФ (таблетирование, капсулирование и т.д.). Однако этот метод перспекти-

вен в случае, если необходимо микрокапсулировать чувствительную ФС (например, белковые/пептидные ЛС), избегая широкого распределения по размеру и низкой воспроизводимости микросфер, а также дезактивации белка во время его приготовления, хранения и высвобождения.

Системы осаждения с использованием форсунок

Основными признанными недостатками процесса TheriForm™, который является наиболее распространенным методом на основе струйной печати, являются: недостаточная твердость получающейся таблетки, неудовлетворенное разрешение и низкое дозирование ФС [8, 139]. Низкая прочность таблетки обычно обусловлена высокой пористостью, в то время как шероховатая поверхность может быть объяснена большим диаметром частиц и расстоянием между линиями печати. Решением данной проблемы может стать не отказ от применения раствора связующего на порошковом слое, а смешивание твердых компонентов системы со связующим до начала 3D-печати. Такой процесс может быть осуществлен с использованием систем осаждения на основе форсунок.

Системы осаждения на основе форсунок позволяют получать прямую печать, основанную на контролируемых компьютером способах изготовления, при которых «чернила» наносят прямо через форсунку для создания слоя трехмерного рисунка с контролируемым составом и структурой [11]. Такие системы в основном можно разделить на системы, основанные на плавлении материала, и системы без плавления материала, при этом особое внимание уделяется методам, опирающимся на микровпрыскивание под давлением (pressure-assisted microsyringes, PAM) и термоплавкую печать (hot melt printing, HMP).

Микровпрыскивание под давлением

Способ печати PAM основан на экструзии вязкого полужидкого материала из шприца-экструдера для создания желаемой трехмерной формы (рисунок 9). Процесс может быть выполнен с непрерывным потоком при комнатной температуре [6, 3]. Поршень разливного автомата, как правило, создает давление ~3–5 бар [15, 107].

Реологические свойства суспензий, которые в значительной степени зависят от типа и количества ВВ, а также загрузки твердого материала в дисперсии, могут рассматриваться как основной параметр контроля для получения воспроизводимых ЛФ [2, 630]. Действительно, паста должна характеризоваться подходящей (эффективной) вязкостью, вязкоупругими свойствами и пределом текучести при сдвиге и сжатии, чтобы

быть гладкой и однородной во избежание блокировки форсунок [16, 6953].

В литературе описаны различные двухслойные таблетки гвайфенезина с замедленным высвобождением на основе ГПМЦ разных сортов [15, 107]. Используя головку принтера с двойным шприцем, матричный гель Methocel® E5 экструдировали для получения слоя с немедленным высвобождением, а для слоя с замедленным высвобождением использовался матричный гель Methocel® K100M / Carbopol® 974P NF. Все гидрофильные таблетки соответствуют спецификациям USP с точки зрения хрупкости (<1%) и отклонений в весе ($\pm 5\%$). Кроме того, в зависимости от концентрации матричного геля в полимере они имеют профиль с пролонгированным высвобождением от 4 до 12 часов.

Наглядно продемонстрирована способность создавать сложные системы доставки ЛС с использованием РАМ. Основным недостатком этой техники, а также систем струйной печати является использование растворителей, так как зачастую применяются токсические органические вещества, которые могут влиять на устойчивость ФС в процессе производства и на стадии сушки. К тому же возникает необходимость в дополнительных стадиях сушки и разработке чувствительных аналитических методов для контроля ЛФ по показателю содержания остаточных органических растворителей, что вызывает сложности. Процесс сушки весьма продолжителен и может привести к ухудшению качества ФС и ВВ. Применение высокоточных аналитических методов делает контроль качества экономически затратным. Более того, как медленное затвердевание, так и сжатие матричного геля часто влияют на конечные физико-химические свойства напечатанных ЛФ. Поэтому разработка процесса трёхмерной печати, который не требует использования растворителя или стадии сушки, представляется актуальной.

Технология осаждения полужидкого материала

В технологии осаждения полужидкого материала (fused-deposition modeling, FDM) расплавленная термопластичная полимерная нить экструдирована двумя роликами через высокотемпературную форсунку, а затем затвердевает на сборочной платформе (рисунок 5) [6, 3]. Печатающая головка может перемещаться вдоль осей x и y, тогда как платформа, которая может быть термостатирована, способна двигаться вертикально по оси z, создавая трехмерные структуры слой за слоем путем слияния слоев вместе.

Типичными параметрами, которые необходимо контролировать во время процесса FDM, являются плотность заполнения, скорость экструдера, высота слоев и температура как форсунки, так и сборочной платформы [11, 88; 12, 158; 27, 13; 21, 572]. Плотность за-

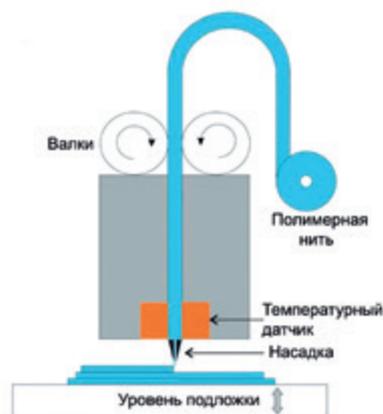


Рисунок 5. Схематичное изображение установки термопластичной печати [31, 199]

полнения является параметром, который определяет количество материала, внесенного в объект, а также отвечает за пористость трехмерной печатной структуры [23, 381]. Плотность заполнения может составлять от 0% до 100%, где 0% приводит к получению полностью пологого объекта, а 100% – к заполнению пор в полностью твердом объекте (рисунок 6). Скорость печати и высота слоев тесно связаны. Действительно, как видно из рисунка 6, выбор скорости 3D-печати (стандартная, 90 мм/с) оказывает значительное влияние на толщину осажденного слоя (обычно от 100 до 400 мкм) и внешний вид систем.

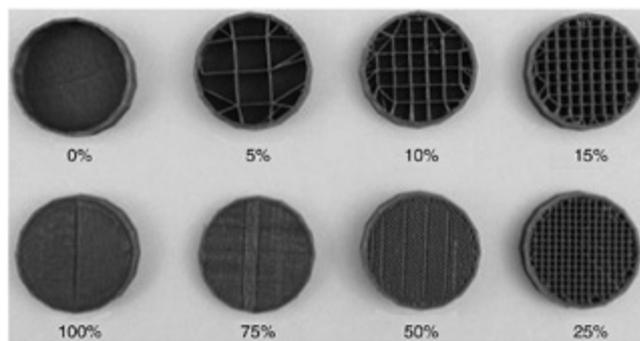


Рисунок 6. Схема процентного заполнения таблеток по технологии FDM [30, 3671]

Полимеры используются либо в виде нити с ФС, включенной в нее путём пропитывания раствором ФС (fused-deposition modeling after impregnation, FMDi), либо в виде гранул с ФС, встроенной в структуру в результате экструзии горячим расплавом (hot melt extrusion, HME) во время изготовления нити (fused-deposition modeling after extrusion, FDMе) (рисунок 2).

После пропитывания полимерных нитей ФС, во время экструзии горячим расплавом, субстанции могут инактивироваться или даже частично разрушаться. Например, в эксперименте включали преднизолон

в ПВС-нити в результате инкубации в насыщенном метанольном растворе при 30 °С в течение 24 часов [27, 13]. Пропитанные нити затем высушивали в контактной сушке при 40 °С до стабильной массы. Далее печатали таблетки, которые имели форму эллипса. Было установлено, что во время экстракции в используемую нить включено лишь 1,9% мас./мас. при незначительной деградации ФС. Из-за включения в структуру и высокой температуры процесса экструзии преднизолон находился в аморфном состоянии в матрице ПВС. Однако его высвобождение могло быть продлено на период до 24 часов за счёт способности набухать при контакте с водными жидкостями.

В связи с тем, что процесс экстракции (импрегнирования) активного вещества в полимерную нить основан на пассивной диффузии, пропитывание следует проводить с использованием высококонцентрированных ЛС, чтобы добиться высокой степени включения ФС. Это условие делает пропитку дорогостоящим и трудоемким процессом, к тому же ФС должна быть очень термостабильной и растворитель не должен растворять и повреждать физическую целостность полимерной нити. Поэтому был разработан альтернативный подход к производству, который основан на сочетании как трехмерной печати FDM, так и технологии экструзии (FDMе).

В технологии FDMе наполненную ФС нить сначала изготавливают методом НМЕ с использованием мини-экструдера в лабораторном масштабе (например, ThermoScientific HAAKE MiniCTW Extruder, Германия; FilaBot®, США). Полимер, ФС и ВВ (например, пластификаторы) плавятся вместе при соответствующей температуре и гомогенизируются в экструдере перед выдавливанием нити. Таким образом, можно изготавливать полимерные нити, которые еще не представлены на рынке.

Например, Pietrzak и его коллеги изготовили системы доставки на основе теофиллина с производными метакриловой кислоты [23, 381]. Они показали, что возможно модулировать температуру плавления путем добавления пластификаторов для уменьшения вероятности термического разложения как ФС, так и полимера. Выход экструдированной, загруженной ФС нити составлял почти 100%, поскольку параметры печати были адаптированы к окончательной пластичности. В отличие от обычных кубических 3D-таблеток они могли печатать таблетки в форме облонгов, которые благодаря своим стереометрическим параметрам обеспечивают лучшую комплаентность пациента. Сохраняя аналогичную форму и параметры печати нитей, дозировку можно легко адаптировать, изменяя объем таблеток. При использовании Eudragit® RL, RS или их смеси в качестве полимеров с замедленным высвобождением высвобождение теофиллина длилось бо-

лее 16 часов в моделируемой желудочной жидкости (USP II, 50 об/мин, 37 °С, 750 мл). Также были напечатаны ЛП различной форме: кубик, пирамида, цилиндр, сфера и тороидальные ЛФ (рисунок 7). Независимо от площади поверхности, массы или форм, которые могут быть установлены с помощью программы 3D-рисования, обнаружено, что скорость высвобождения ФС определяется только отношением площади поверхности к объему (S/V) таблеток, которое характеризуется сходными тенденциями. Действительно, время выпуска до 90% вещества варьировалось от 2 до 12 часов для ЛП пирамидальной формы (самое высокое отношение S/V) и сферической формы (самое низкое отношение S/V) соответственно. Это исследование показало, что процесс FDM можно использовать для создания сложных геометрий и что в соответствии с формой системы доставки ЛС можно контролировать профиль растворения лекарственного средства.

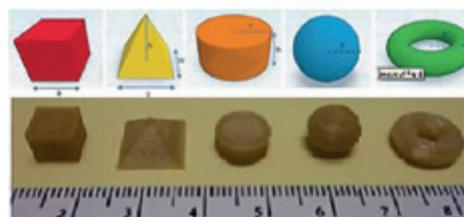


Рисунок 7. ЛФ разной геометрии, полученные при помощи 3D-печати [23, 383]

FDM представляет собой недорогой производственный процесс, который является привлекательной альтернативой традиционным методам приготовления твердых дозированных ЛФ. Этот метод продемонстрировал возможность обеспечить требуемый уровень высвобождения путём изменения формы ЛФ при постоянном объеме и содержании ЛС. Профиль высвобождения встроенного препарата также поддается регулировке из-за безграничной возможности печати разнообразных геометрических ЛФ. По сравнению с другими методами быстрого прототипирования FDM может легко производить ЛФ с закругленными краями и углами, что увеличивает комплаентность пациентов. Необходимость высоких температур для создания полимерной матрицы позволяет формировать аморфные структуры, что повышает растворимость слаборастворимых ФС. Тем не менее эта технология ограничена небольшим количеством и термостабильностью ФС, а также использованием лимитированного числа биodeградируемых термопластичных полимеров, что снижает частоту ее применения. Кроме того, в то время как пропитка приводит к очень низкому количеству вводимой ФС, процесс НМЕ с высоким соотношением ФС/полимер может влиять на исходные термопластичные свойства полимера и последующую способность печатать ЛФ с высокой дозировкой ФС.

Лазерные системы трёхмерной печати

Стереолитография, лазерная технология 3D-печати, была разработана в 1986 году и стала первой коммерчески доступной техникой быстрого прототипирования [22, 6128].

Общая концепция стереолитографии основана на высвобождении молекул свободных радикалов при взаимодействии молекул фотоинициатора с ультрафиолетовым светом [13, 345]. Она использует УФ-излучение для переноса геометрического рисунка на светочувствительный химический жидкий полимер на подложке. Сфокусированный луч УФ-лазера векторно сканирует поверхность ванны с фотополимеризуемой жидкой полимерной пластичной смолой. Полимеризация может происходить на несколько микрометров ниже поверхности, что приводит к затвердеванию смолы [22, 6128]. Когда первый слой сформирован, его опускают в ванну до глубины, эквивалентной толщине полимеризованного слоя, который повторно покрывают жидкой смолой. После этого образец твердеет на втором слое, поскольку УФ-излучение имеет глубину проникновения, превышающую толщину слоя. Такая процедура способствует связыванию ранее затвердевшего материала, что обеспечивает адгезию между слоями. Процесс повторяют до тех пор, пока не будет получено множество наложенных друг на друга слоев, образующих желаемую часть; избыток непolyмеризованной смолы смывается [25].

Основным параметром, который нужно контролировать, является толщина затвердевших слоев, которая в основном зависит от энергии света, воздействующего на смолу [22, 6129]. Выбор смолы также необходим, так как это должна быть жидкость, которая быстро затвердевает при освещении ультрафиолетовым светом. Более того, смола должна быть одобрена для использования человеком. По этим причинам низкомолекулярные полиакрилатные макромеры пригодны для разработки ЛФ.

Стереолитография является привлекательной альтернативой в области печати микроструктур, поскольку реализовать этот процесс с использованием других методов трёхмерной печати гораздо сложнее. Однако из-за отсутствия доступных, одобренных FDA светочувствительных полимеров, которые также должны быть способны контролировать высвобождение объединенного препарата, и низкой загрузки ЛС стереолитография становится более сложным методом для промышленного применения, чем другие методы трёхмерной печати.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Технология трёхмерной печати – наиболее перспективное и динамично развивающееся направление в фармацевтической технологии, внедре-

ние которого тесно связано с развитием персонализированной медицины [1, 16]; метод обладает несомненными преимуществами перед традиционными методами разработки и производства ЛП.

2. Технология позволяет получать полифункциональные ЛФ с точным пространственным контролем положения ФС и геометрической гибкостью, к тому же становится возможным разрабатывать и изготавливать сложные высокоинновационные комбинированные ЛП с различной программируемой кинетикой высвобождения, которые могут значительно повысить комплаентность пациентов в отношении ЛС со сложными режимами дозирования.
3. Системы 3D-печати в соответствии со своей основной концепцией легко масштабируемы, имеют возможность настройки для использования в качестве полунепрерывных или непрерывных производственных линий как для производства небольших объемов продукции (например, орфанные продукты), так и выпуска ее в промышленных масштабах.
4. Возможность точного контроля дозирования ЛП, обладающих низкой дозировкой, может привести к большей безопасности применения сильнодействующих ФС. В аптеке или в амбулатории трехмерная печать позволяет получать препараты с различной дозировкой в зависимости от потребности пациента, обеспечивая беспрецедентную возможность индивидуализирования дозировки.
5. Использование 3D-печати при скрининге, разработке и изготовлении систем доставки ФС будет расширяться, поскольку она дает возможность обеспечить специализированные профили высвобождения ЛС для каждого пациента.
6. Дальнейшее развитие технологий 3D-печати ЛС должно идти по пути увеличения скорости производства ЛФ, так как, к примеру, для таблетированных форм скорость производства в десятки раз уступает скорости при традиционных способах изготовления ЛФ, при этом существует большая потребность во ВВ, пригодных для использования в технологическом процессе. В частности, необходимы полимерные ВВ для технологии FDM, к тому же 3D-таблетки, полученные и струйной печатью, и FDM, значительно уступают традиционным таблеткам по механической прочности и внешнему виду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Терентьева О. А., Флисюк Е. В. О возможностях использования технологий трехмерной печати для создания персонализированных лекарственных средств // Наука и человечество.

- Роль техники и науки в современном мире. Материалы международной научно-практической конференции. 2016. С. 15–18 [Terent'eva O. A., Flisyuk E. V. O vozmozhnostyah ispol'zovaniya tekhnologij trekhmernoj pečati dlya sozdaniya personalizirovannyh lekarstvennyh sredstv // Nauka i chelovechestvo. Rol' tekhniki i nauki v sovremennom mire. Materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi koferentsii. [About the possibilities of using 3D printing technologies to create personalized medicines // Science and humanity. The role of technology and science in the modern world. Materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi koferentsii.] 2016. P. 15–18.]
2. Aho J., Boetker J. P., Baldursdottir S. et al. Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms // International journal of pharmaceutics. 2015. V. 494. № 2. P. 623–642.
 3. Alomari M., Mohamed, F. H., Basit, A. W. et al. Personalised dosing: printing a dose of one's own medicine // International journal of pharmaceutics. 2015. V. 494. № 2. P. 568–577.
 4. Badgajar B., Mundada A. The technologies used for developing orally disintegrating tablets: a review // Acta pharmaceutica. 2011. V. 61. № 2. P. 117–139.
 5. Chua C. K., Leong K. F., An J. Introduction to rapid prototyping of biomaterials // Rapid prototyping of biomaterials. 2014. P. 1–15.
 6. Chia H. N., Wu B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials // Journal of biological engineering. 2015. V. 9. № 1. P. 4.
 7. De Groot N. L., Spiegel B. M. R., van Haalen H. G. M. et al. Gastroprotective strategies in chronic NSAID users: a cost-effectiveness analysis comparing single-tablet formulations with individual components // Value in Health. 2013. V. 16. № 5. P. 769–777.
 8. Dimitrov D., Schreve K., De Beer N. Advances in three dimensional printing—state of the art and future perspectives // Rapid Prototyping Journal. 2006. V. 12. № 3. P. 136–147.
 9. Daly R., Harrington T. S., Martin G. D. et al. Inkjet printing for pharmaceutics – a review of research and manufacturing // International journal of pharmaceutics. 2015. V. 494. № 2. P. 554–567.
 10. Elele E., Shen, Y., Susarla, R. et al. Electrodeless electrohydrodynamic drop-on-demand encapsulation of drugs into porous polymer films for fabrication of personalized dosage units // Journal of pharmaceutical sciences. 2012. V. 101. № 7. P. 2523–2533.
 11. Goyanes A., Buanz A. B., Basit A. W. et al. Fused-filament 3D printing (3DP) for fabrication of tablets // International journal of pharmaceutics. 2014. V. 476. № 1–2. P. 88–92.
 12. Goyanes A., Buanz A. B., Hatton G. B. et al. 3D printing of modified-release aminosalicylate (4-ASA and 5-ASA) tablets // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015. V. 89. P. 157–162.
 13. Gittard S. D., Narayan R. J. Laser direct writing of micro-and nano-scale medical devices // Expert review of medical devices. 2010. V. 7. № 3. P. 343–356.
 14. Günther D., Heymel B., Franz J. et al. Continuous 3D-printing for additive manufacturing // Rapid Prototyping Journal. 2014. V. 20. № 4. P. 320–327.
 15. Khaled S. A., Burley, J. C., Alexander, M. R. et al. Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets // International journal of pharmaceutics. 2014. V. 461. № 1–2. P. 105–111.
 16. Kuang M., Wang L., Song Y. Controllable printing droplets for high-resolution patterns // Advanced materials. 2014. V. 26. № 40. P. 6950–6958.
 17. Katstra W. E., Palazzolo R. D., Rowe C. W. et al. Oral dosage forms fabricated by Three Dimensional Printing™ // Journal of controlled release. 2000. V. 66. № 1. P. 1–9.
 18. Lee J. Y., Choi B., Wu B. et al. Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering // Biofabrication. 2013. V. 5. № 4. P. 45.
 19. Lewis J. A., Gratson G. M. Direct writing in three dimensions // Materials today. 2004. V. 7. № 7. P. 32–39.
 20. Moulton S. E., Wallace G. G. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems // Journal of Controlled Release. 2014. V. 193. P. 27–34.
 21. Mohanty S., Larsen L. B., Trifol J. et al. Fabrication of scalable and structured tissue engineering scaffolds using water dissolvable sacrificial 3D printed moulds // Materials Science and Engineering: 2015. V. 55. P. 569–578.
 22. Melchels F. P. W., Feijen J., Grijpma D. W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering // Biomaterials. 2010. V. 31. № 24. P. 6121–6130.
 23. Pietrzak K., Isreb A., Alhnan M. A. A flexible-dose dispenser for immediate and extended release 3D printed tablets // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2015. V. 96. P. 380–387.
 24. Siegel R. A., Rathbone M. J. Overview of controlled release mechanisms // Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. Springer US, 2012. P. 19–43.
 25. Patent USA 5204055. Three-dimensional printing techniques / Sachs E. M. et al. 1993.
 26. Sandler N., Määttänen A., Ihalainen P et al. Inkjet printing of drug substances and use of porous substrates-towards individualized dosing // Journal of pharmaceutical sciences. 2011. V. 100. № 8. P. 3386–3395.
 27. Skowrya J., Pietrzak K., Alhnan M. A. Fabrication of extended-release patient-tailored prednisolone tablets via fused deposition modelling (FDM) 3D printing // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015. V. 68. P. 11–17.
 28. Thakral S., Thakral N. K., Majumdar D. K. Eudragit®: a technology evaluation // Expert opinion on drug delivery. 2013. V. 10. № 1. P. 131–149.
 29. Rowe C. W., Katstra W. E., Palazzolo R. D. et al. Multimechanism oral dosage forms fabricated by three dimensional printing™ // Journal of controlled release. 2000. V. 66. № 1. P. 11–17.
 30. Yu D. G., Zhu L. M., Branford-White C. J. et al. Three-dimensional printing in pharmaceutics: promises and problems // Journal of pharmaceutical sciences. 2008. V. 97. № 9. P. 3666–3690.
 31. Yun Y. H., Kim J. D., Lee B. K. et al. Polymer inkjet printing: Construction of three-dimensional structures at micro-scale by repeated lamination // Macromolecular research. 2009. V. 17. № 3. P. 197–202.

УДК 615.454.1

ВЫБОР ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ГЕЛЯ ДЛЯ ПРИЁМА ВНУТРЬ «РАЛИТИН»

Е. Ю. Загоруйко^{1*}, А. А. Теслев¹

Резюме. В статье представлены результаты исследований по выбору вспомогательных веществ геля для приёма внутрь «Ралитин» на основе извлечения из ромашки аптечной цветков, содержащего сумму флавоноидов и эфирное масло. Извлечение получено с помощью разработанной ранее технологии ультразвукового экстрагирования. Исследованы гелевые композиции извлечения с натрийкарбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ), карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), агар-агаром, карбомером, ксантановой камедью, гуммиарабиком, пектином яблочным и их смесями: Na-КМЦ – гуммиарабик, КМЦ – гуммиарабик, пектин яблочный – агар, ксантановая камедь – гуммиарабик. Проведены исследования по выбору корректоров вкуса и запаха из следующих веществ: ароматизаторов (апельсиновый, малиновый, банановый, кокосовый) и коммерчески доступных смесей подсластителей, содержащих натрия сахаринат, натрия цикламат, фруктозу, стевиозид, экстракт листьев стевии, инулин, сукралозу, эритриол. Исследовано введение в гелевые композиции кислоты лимонной в разных концентрациях в качестве подкислителя и регулятора pH. Для гелевых композиций оценивали внешний вид, pH 5% водного извлечения, устойчивость при повышенной температуре (40 °C), реологические характеристики: динамическую вязкость (при заданной скорости сдвига 50 с⁻¹) и зависимость вязкости от скорости сдвига в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 200 с⁻¹ и от 200 до 10 с⁻¹. Органолептические характеристики гелевых композиций оценивали с помощью профильного метода и метода оценки с использованием буквенных и числовых индексов И. А. Егорова. Для разработанного состава геля для приёма внутрь определяли стабильность, агрегативную устойчивость, реологические характеристики, высвобождение флавоноидов (тест «Растворение»), профиль вкуса. Агрегативная устойчивость геля «Ралитин» была изучена в условиях естественного хранения (20 °C) и при повышенной температуре (40 °C). Установлено, что значение коэффициента кинетической устойчивости образцов гелей не изменялось в течение 6 месяцев хранения и оставалось равным 0, что позволяет считать данную систему агрегативно устойчивой. При исследовании высвобождения суммы флавоноидов установлено, что в течение первых 5 минут из геля «Ралитин» в среду растворения высвобождается около 90% суммы флавоноидов. При изучении стабильности геля в процессе хранения методом «ускоренного старения» установлено, что полученный гель стабилен в течение всего экспериментального срока хранения (2 года). В состав геля для приема внутрь «Ралитин» на основе извлечения из ромашки аптечной цветков входят: гелеобразователь – Na-КМЦ, консервант – кислота сорбиновая, коррективы – сукралоза с инулином, ароматизатор банановый, кислота лимонная. Таким образом, проведен выбор вспомогательных веществ геля для приема внутрь «Ралитин». Полученный гель обладает приемлемыми реологическими характеристиками, профилем высвобождения и органолептическими свойствами.

Ключевые слова: гель для приема внутрь, разработка состава, ромашки аптечной цветки, флавоноиды, гелеобразователь, коррективы, профиль вкуса.

EXCIPIENTS SELECTION AND CHARACTERIZATION FOR «RALITIN» GEL FOR ORAL ADMINISTRATION

Е. Y. Zagorulko^{1*}, A. A. Teslev¹

Abstract. The results of the investigation on the excipients selection for "Ralitin" gel for oral administration containing Matricaria flowers extractives (sum of flavonoids, essential oil) are presented in the article. The extractive was obtained using previously developed ultrasonic extraction technology. Gel compositions of the extractive with sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC), carboxymethyl cellulose (CMC), agar, carbomer, xanthan gum, gum arabic, apple pectin and mixtures thereof (Na-CMC – gum arabic, CMC – gum arabic, apple pectin – agar, xanthan gum – gum arabic) were studied. Studies on the selection of flavouring agents (orange, raspberry, banana, coconut) and commercially available sweeteners containing sodium saccharinate, sodium cyclamate, fructose, stevioside, stevia leaf extract, inulin, sucralose, and erythritol were carried out. Use of citric acid in the gel compositions at various concentrations as an acidulant and a pH regulator was investigated. The appearance, pH 5% aqueous solution, stability at elevated temperature (40 °C), rheological characteristics: dynamic viscosity (at a given shear rate of 50 s⁻¹) and viscosity vs. shear rate (the shear rate measurement range was between 10 s⁻¹ and 200 s⁻¹ and vice versa) were evaluated for the gel compositions. The organoleptic characteristics of the gel compositions were evaluated using the profile method and the evaluation method with letter and numerical indexes by I. A. Egorov. The stability, aggregative stability, rheological characteristics, flavonoids release ("Dissolution" test), taste profile were determined for the developed gel composition for oral administration. The aggregative stability of "Ralitin" gel was studied under conditions of natural storage (20 °C) and at elevated temperature (40 °C). It was established that the value of the kinetic stability coefficient of the gel samples did not change during 6 months of storage and remained equal to 0, which allows considering the system as aggregatively stable. In examination of the sum of flavonoids release, it was found that about 90% of the total amount of flavonoids was released from "Ralitin" gel into the dissolution medium during the first 5 minutes. In studying stability of the gel during storage by the "accelerated aging" method, it was established that the obtained gel is stable during the entire experimental shelf life (2 years). "Ralitin" gel on the basis of Matricaria flowers extractive contains Na-CMC as a gelation agent, sorbic acid as a preservative, and flavouring agents – sucralose with inulin, banana flavour, and citric acid. Thus, the excipients selection for the formulation of "Ralitin" gel for oral administration has been carried out. Rheological characteristics, dissolution profile and organoleptic properties of the resulting gel are acceptable.

Keywords: gel for oral administration, formulation, Matricaria flowers, flavonoids, gelation agent, flavouring agents, taste profile.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14

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

* адресат для переписки:

E-mail: elena.zagorulko@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Гель для приёма внутрь является перспективной лекарственной формой (ЛФ), сочетающей в себе удобство приёма и биодоступность, сравнимую с жидкими пероральными ЛФ [1, с. 30; 32, с. 82].

В настоящее время на рынке представлены лекарственные препараты (ЛП), биологически активные добавки (БАД) к пище и продукты функционального питания в форме гелей для приема внутрь [9, с. 42–45]. Несмотря на распространенность БАД к пище, содержащих фитокомпоненты, в настоящее время отсутствуют ЛП в форме гелей для приёма внутрь на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) [9, с. 47–48; 6; 17].

Известно, что зарегистрированные в России ЛП в форме гелей для приёма внутрь предназначены для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), при этом среди препаратов данной группы не представлены спазмолитические средства [6]. Гели обладают обволакивающим действием и могут оказывать благоприятное воздействие на слизистую, что делает эту ЛФ перспективной для использования при заболеваниях ЖКТ [9, с. 47; 32, с. 82].

Одним из достоинств пероральных жидких и мягких ЛФ является простота и естественность пути введения препарата, сочетающиеся с высокой биологической доступностью таких форм. Выбор подобной формы позволяет комплексно решить проблемы коррекции вкуса и запаха, стабильности и высвобождения ЛВ, технологичности процесса производства [32, с. 85; 19, с. 30–32; 33, с. 288].

Гели для приёма внутрь характеризуются удобством применения, лёгкостью проглатывания (в отличие от многих твёрдых форм их не требуется запивать водой). Применение данной ЛФ позволяет в некоторой мере решить проблему коррекции органолептических свойств лекарственных веществ (ЛВ): известно, что в вязких средах отмечен эффект ослабления вкусовых свойств продукта. Макромолекулы высокомолекулярных соединений или мицеллы коллоидных систем, присутствующие в такой среде, покрывают большое количество вкусовых рецепторов языка и обволакивают частицы ЛВ, препятствуя их взаимодействию и снижая интенсивность вкусовых ощущений [32, с. 82; 19, с. 235].

Одним из официальных видов ЛРС, применяемого для лечения заболеваний ЖКТ, являются ромашки аптечной цветки. Галеновые препараты на основе ромашки аптечной цветков назначают внутрь как спазмолитическое средство [15; 24; 25, с. 332–333]. Основными группами биологически активных веществ ромашки аптечной цветков, обеспечивающими развитие миотропного спазмолитического эффекта, являются эфир-

ные масла и флавоноиды [15; 25, с. 332; 26, с. 247–250]. Таким образом, разработка геля для приёма внутрь на основе ромашки аптечной цветков представляет научный и практический интерес.

Целью работы являлся выбор вспомогательных веществ геля для приёма внутрь «Ралитин» на основе извлечения из ромашки аптечной цветков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали извлечение из ромашки аптечной цветков (ЛРС – АО «Красногорсклексредства», серия 130616), полученное с помощью разработанной ранее технологии ультразвукового экстрагирования [11, с. 157]. Извлечение содержит суммы флавоноидов в пересчете на рутин – 0,15–0,18%, эфирного масла – 0,05–0,07%. В состав извлечения в качестве солюбилизатора входит 0,1–0,3% твина-80 («НеваРеактив», Россия).

При разработке состава геля для приёма внутрь были изучены следующие гелеобразователи: натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-KMЦ) (Blanose™ 7 HF PH, Ashland™), карбоксиметилцеллюлоза (KMЦ) (Akucell® AF 2785, Akzo Nobel, Нидерланды), агар-агар (Агар 900, Qixiang, Китай), карбомер (Carbopol™ 971P NF, IMCD), ксантановая камедь (NOW® FOODS, США), гуммиарабик (Instantgum™ BA, CNI, Франция), пектин яблочный (APA 170, Yantai Andre Pectin Co. Ltd., Китай).

Ароматизаторы: апельсиновый (Frontier® Co-op, США), малиновый (Frontier® Co-op, США), банановый (Frontier® Co-op, США), кокосовый (Frontier® Co-op, США).

Смеси подсластителей: Рио® Голд (Sweet Life AG, Швейцария) – смесь 1, Süss (Nutrisun GmbH CoKG, Германия) – смесь 2, стевия (Nutrisun GmbH CoKG, Германия) – смесь 3, сукралоза с инулином (Nutrisun GmbH CoKG, Германия) – смесь 4, Фит® Парад №10 (ООО «Питэко», Россия) – смесь 5.

Кислоты: кислота сорбиновая («Вектон», Россия) – консервант, кислота лимонная («Вектон», Россия) – антиоксидант, стабилизатор, регулятор pH и подкислитель.

При получении гелей на основе KMЦ и Na-KMЦ порошок гелеобразователя диспергировали в воде очищенной (или в растворе гуммиарабика при получении соответствующих составов) и оставляли для набухания при комнатной температуре, затем нагревали при температуре 70 °С до его растворения.

В гелях, содержащих пектин яблочный, порошок пектина вводили при перемешивании в водный раствор сорбитола («НеваРеактив», Россия), нагретый до 70 °С, в результате чего образовывался гель пектина.

Агар-агар растворяли в воде очищенной при нагревании 95–100 °С.

Извлечение из цветков ромашки аптечной вводили в указанные гели при температуре около 40 °С и перемешивали до однородности.

При получении гелей на основе ксантановой камеди порошок гелеобразователя диспергировали в водном растворе извлечения из цветков ромашки при комнатной температуре и оставляли набухать до растворения и образования геля.

Порошок карбомера диспергировали в водном растворе извлечения из цветков ромашки. После набухания полимера добавляли при перемешивании раствор трис(гидроксиметил)аминометана (триметамол) («НеваРеактив», Россия), доводя рН до значений 6–7.

Вязкость гелей определяли на программируемом вискозиметре Brookfield DV-II+PRO (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., США) при температуре 20±1 °С в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 200 с⁻¹.

Значения рН 5% водных извлечений гелей определяли потенциометрически на рН-метре-милливольтметре рН-410 («Аквилон», Россия): навеску геля растворяли в воде очищенной, полученный раствор отфильтровывали и определяли рН фильтрата.

Агрегативную устойчивость определяли для образцов геля сразу после их получения, а также после хранения при температурах 20 и 40 °С в течение 7 суток; 1,5; 3 и 6 месяцев. Навеску геля помещали в пробирку и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 5 минут. При этом определяли коэффициент кинетической устойчивости, который рассчитывали как отношение высот выделившейся при центрифугировании фазы геля и общей высоты образца [4, с. 118; 22, с. 19].

Определение стабильности геля проводили методом «ускоренного старения».

Для определения вкусоароматических характеристик гелевых композиций использовали профильный метод органолептической оценки и метод оценки с использованием буквенных и числовых индексов И. А. Егорова [23, с. 664]. Для профильного метода использовали 5-балльную шкалу: 0 – признак отсутствует; 1 – только узнаваемый или ощущаемый; 2 – слабая интенсивность; 3 – умеренная интенсивность; 4 – сильная; 5 – очень сильная интенсивность [18, с. 79]. При оценке по методу И. А. Егорова использовали буквенные индексы вкуса: К (кислый), С (сладкий), Г (горький) – и числовые индексы: 1 – признак отсутствует; 2 – признак выражен слабо; 3 – признак нормальной интенсивности; 4 – признак выражен очень сильно [23, с. 664–665].

Исследование высвобождения проводили на установке для проведения испытаний на растворение DS 8000 Labindia (Labindia, Индия) в аппарате «Лопастная мешалка»: скорость вращения мешалки –

50 об/мин, среда растворения – вода очищенная, объём среды растворения – 500 мл, температура среды – 37±0,5 °С; масса образца – 30,0 г (масса содержимого однодозовой упаковки). Пробы отбирали через 2, 5, 10, 15, 20, 30 и 45 минут. В пробах определяли содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII [7, с. 235–264].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из основных этапов разработки состава геля для приёма внутрь является выбор гелеобразователя. При выборе гелеобразователя учитывали возможность его перорального приёма, физико-химические и технологические свойства, реологические характеристики полученных гелевых композиций, органолептические свойства основы и возможность их коррекции.

Широкое применение при создании пероральных продуктов с заданными реологическими свойствами находят гидроколлоиды – высокомолекулярные соединения полисахаридной или белковой природы, применяемые в пищевой промышленности [31, с. 1–2].

Из гидроколлоидов, часто входящих в состав гелей для приёма внутрь [10, с. 42], и гелеобразователей, разрешенных к пероральному приему [16, с. 30–33], выбраны следующие вещества: Na-КМЦ, КМЦ, агар-агар, карбомер, ксантановая камедь, гуммиарабик, пектин яблочный и их комбинации. Введение гуммиарабика может улучшать текстурные свойства гелевых основ, увеличивая их текучесть в случае вязких гелей и способствуя загущению маловязких. Введение агара в пектиновые гели способствует получению более хрупкой текстуры геля [31, с. 91–96, с. 265–269].

Чаще всего в состав гелей для приёма внутрь в качестве консервантов входят сорбиновая, бензойная кислоты или их соли [10, с. 42; 8, с. 27]. Кислота сорбиновая – хорошо изученный консервант, широко используемый в течение длительного времени как для ЛП для приёма внутрь, так и для пищевых продуктов. В научной литературе представлены достаточные сведения о её безопасности при пероральном приёме. Сорбиновая кислота обладает высокой активностью в отношении дрожжевых и плесневых грибов, а также антибактериальным действием [19, с. 243; 14, с. 131–132]. Таким образом, её применение в качестве консерванта геля для приёма внутрь целесообразно с учётом опыта её использования, подтвержденного практикой и данными научной литературы. Выбранная концентрация (0,1%) соответствует нормам её использования [8, с. 29; 14, с. 132–133].

Были изучены следующие диапазоны концентраций гелеобразователей: Na-КМЦ – 0,5–4,0%, КМЦ – 0,5–4,0%, ксантановой камеди – 0,5–3,0%, агар-агара – 0,1–1,0%, пектина – 2,0–10,0%, карбомера – 0,3–1,5% и различных их соотношений [Na-КМЦ – гуммиарабик (от 1:1 до 1:10), КМЦ – гуммиарабик (от 1:1 до 1:10), пектин – агар (от 1:1 до 5:0,1), ксантановая камедь – гуммиарабик (от 1:1 до 1:10)].

Известно, что гели для приёма внутрь должны обладать характеристиками, обеспечивающими легкость их проглатывания [30, с. 347–348], которая может быть косвенно оценена по совокупности текстурных свойств, однородности и консистенции геля.

Выбор рабочей концентрации гелеобразователей осуществляли на основе данных исследований

по результатам анализа обобщенной функции желательности Харрингтона, позволяющей интегрально оценить органолептические и потребительские свойства исследуемых гелевых композиций [27, с. 494–498]. В качестве откликов функции желательности использовали следующие: консистенцию, текстуру, однородность и прозрачность полученных составов.

Выбранные для дальнейшего изучения композиции гелевых основ с извлечением из ромашки аптечной цветков представлены в таблице 1.

Оценивали внешний вид гелевых композиций, pH 5% водного извлечения и динамическую вязкость (при заданной скорости сдвига 50 с⁻¹). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1.

Составы гелевых композиций с извлечением из ромашки аптечной цветков

Компонент	Номер состава									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Извлечение из ромашки аптечной цветков	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Na-КМЦ	2,0	2,0	–	–	–	–	–	–	–	–
КМЦ	–	–	1,5	1,5	–	–	–	–	–	–
Ксантановая камедь	–	–	–	–	1,0	–	–	–	–	1,0
Гуммиарабик	–	5,0	–	5,0	–	–	–	–	–	5,0
Агар-агар	–	–	–	–	–	0,1	–	0,1	–	–
Пектин яблочный	–	–	–	–	–	–	8,0	3,0	–	–
Карбомер С971 Р	–	–	–	–	–	–	–	–	0,5	–
Трометамол раствор 15%	–	–	–	–	–	–	–	–	q.s.	–
Сорбитол 70% кристаллизуемый	–	–	–	–	–	–	50,0	25,0	–	–
Кислота сорбиновая	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Твин-80	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Вода очищенная	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0

Таблица 2.

Характеристика гелевых композиций

Номер состава	Описание	pH водного извлечения	Динамическая вязкость, мПа·с
1	Однородная прозрачная вязкая гелеобразная масса желто-оранжевого цвета	4,8±0,2	7110±450
2	Однородная, слегка опалесцирующая подвижная гелеобразная масса коричневатого-желтого цвета	4,6±0,2	6230±390
3	Однородная прозрачная вязкая гелеобразная масса желто-оранжевого цвета	4,8±0,1	2300±280
4	Однородная, слегка опалесцирующая подвижная гелеобразная масса коричневатого-желтого цвета	4,9±0,2	2540±250
5	Однородная опалесцирующая непрозрачная вязкая текучая гелеобразная масса желто-коричневого цвета	4,7±0,1	2520±180
6	Однородная, слегка опалесцирующая студневидная подвижная масса светло-коричневого цвета	4,2±0,2	2100±260
7	Однородная вязкая непрозрачная масса коричневого цвета с характерным запахом пектина яблочного	3,1±0,2	10530±520
8	Однородная, слегка опалесцирующая вязкая малотекучая гелеобразная масса коричневатого-кремового цвета	3,4±0,1	4400±450
9	Однородная прозрачная подвижная текучая гелеобразная масса желтого цвета	7,0±0,1	1735±30
10	Однородная опалесцирующая непрозрачная вязкая гелеобразная масса светло-коричневого цвета	4,6±0,2	2880±300

Оценку устойчивости композиций гелевых основ с извлечением из цветков ромашки аптечной проводили путем экспозиции при температуре 40 °С в течение 7 суток. Установлено, что в составах 2, 4, 6, 8 и 10 наблюдались признаки расслоения: в составах, содержащих гуммиарабик (2, 4 и 10), обнаружено выделение светло-желтой опалесцирующей фазы, в составах 6 и 8, содержащих 0,1% агара, наблюдалось выделение жидкой фазы. В связи с этим указанные гелевые композиции исключены из последующего изучения, для дальнейших исследований выбраны составы 1, 3, 5, 7, 9.

Знание структурно-механических свойств гелей позволяет прогнозировать особенности процесса производства, а также в значительной мере определяет выбор упаковки и удобство приёма, поэтому представляло интерес изучить реологические свойства указанных составов.

Значение вязкости системы при температуре производства является важным технологическим показателем. Поскольку исследуемые составы получали при разных температурах, представляло интерес сравнение реологических свойств гелей в одинаковых температурных условиях. В связи с этим была выбрана температура 20 °С, находящаяся в температурном диапазоне, соответствующем условиям хранения всех гелевых составов и оценке потребительских свойств геля. Указанный температурный режим используют при исследовании реологических свойств как мягких лекарственных форм в целом [21, с. 102–124], так и гелей для приёма внутрь [4, с. 119; 29, с. 317; 12, с. 28; 3, с. 99].

Представляла интерес оценка и сравнение реологических свойств гелевых систем в широком интервале скоростей сдвига. При определении вязкости на программируемом вискозиметре Brookfield DV-II+PRO (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., США) диапазон скоростей сдвига от 10 до 200 с⁻¹ и от 200 до 10 с⁻¹ был выбран на основании данных о значениях крутящего момента при заданном шпинделе. Для каждого исследуемого состава в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 200 с⁻¹ значения крутящего момента находились в допустимых пределах (от 10 до 100%).

Кривые вязкости гелевых композиций представлены на рисунке 1.

На основании анализа представленных данных (рисунок 1) установлено, что значения вязкости образцов зависят от скорости сдвига: при её увеличении вязкость снижается. Составы 1, 3, 5 и 9, содержащие Na-КМЦ, КМЦ, ксантановую камедь и карбомер соответственно, восстанавливают вязкость после приложенного усилия в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 200 с⁻¹ и от 200 до 10 с⁻¹, что свидетельствует о наличии структуры в указанных композициях. У состава 7, содержащего пектин яблочный, происходит изменение структуры под воздействием приложенного уси-

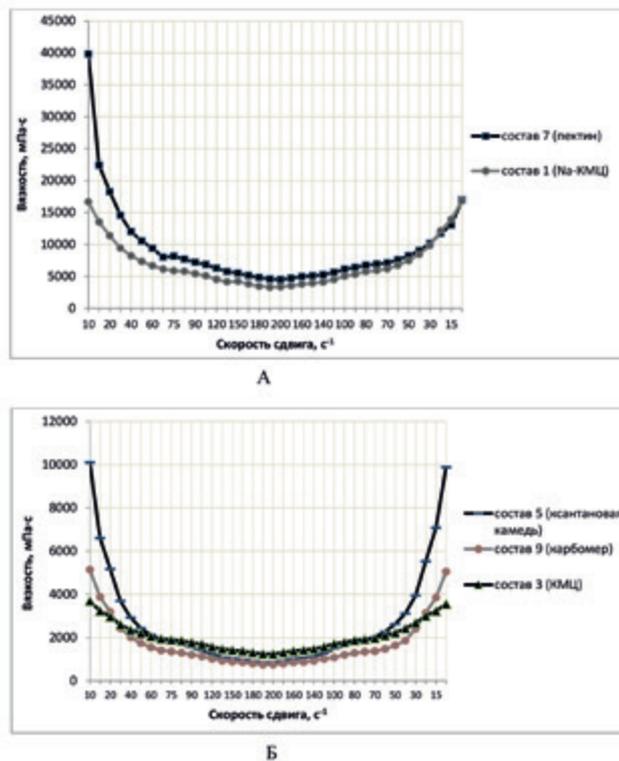


Рисунок 1. Кривые вязкости гелевых композиций:
А – составы 1 и 7; Б – составы 3, 5 и 9

лия сдвига, при этом значения вязкости после снятия нагрузки не восстанавливаются до исходных.

На COMPLAINTность пероральных форм, особенно жидких и мягких, значительным образом влияют их органолептические свойства. Вкус гелей для приема внутрь во многом определяется вкусовыми характеристиками гелеобразователя.

Для оценки органолептических характеристик гелевых композиций использовали профильный метод. Профилограммы вкуса представлены на рисунке 2.

На основании анализа профилограмм вкуса (рисунок 2) установлено, что все исследуемые композиции имели растительный вкус и горькое послевкусие, свойственные данному ЛРС, что обуславливает необходимость корректировки вкусовых свойств гелевых основ.

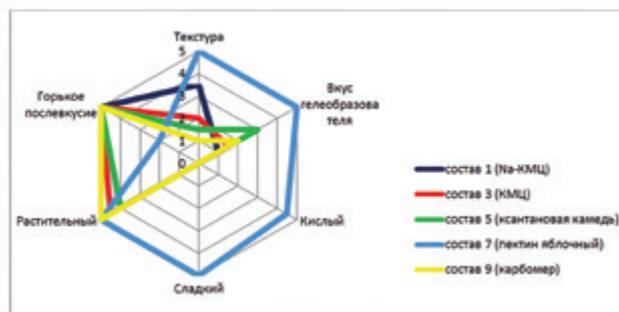


Рисунок 2. Профилограммы вкуса гелевых композиций

При этом у некоторых составов отмечен также характерный вкус гелевой основы. Это относится к составу 7, который обладает выраженным кислым и сладким вкусом. Дополнительно отмечено, что характерный вкус пектина яблочного подчеркивает и усиливает растительный вкус данного образца. Состав 5 имеет характерный привкус гелеобразователя умеренной интенсивности. Поэтому для составов 5 и 7 необходима дополнительная коррекция вкуса.

Состав 9 обладал слабым, невыраженным вкусом гелеобразователя. При этом важно заметить, что гели на основе карбомеров чувствительны к сдвигам pH, что может приводить к необходимости их дополнительной стабилизации.

Наименее выраженный, близкий к нейтральному, вкус гелеобразователя наблюдался у составов 1 и 3 (на основе Na-KМЦ и КМЦ соответственно). Вкусовые характеристики двух композиций в целом сходны, при этом отмечено, что состав 1 обладает несколько более плотной текстурой.

Таким образом, оценка устойчивости, реологических характеристик и органолептических свойств гелевых композиций показывает, что для разработки геля на основе извлечения из ромашки пригодны гелеобразователи, содержащиеся в составах 1, 3, 5, 7, 9.

При этом гели на основе Na-KМЦ отличает простота технологии, стабильность в широком диапазоне температур и интервале значений pH 4–11, отсутствие необходимости введения регуляторов pH, загустителей и т.п., приемлемые реологические свойства, а также высокая микробиологическая стабильность [20, с. 20–24; 33, с. 296]. В связи с этим для дальнейших исследований выбран состав 1 на основе Na-KМЦ.

Основной задачей улучшения вкусовых характеристик указанной композиции является коррекция растительного вкуса и горького послевкусия, обусловленных ЛРС, что может быть достигнуто введением подсластителей, ароматизаторов и веществ, обладающих кислым вкусом [5]. Выбор веществ для маскировки вкусовых свойств проводили с учётом взаимодействия корригентов вкуса и запаха между собой и их способности снижать нежелательные вкусовые ощущения.

Была изучена возможность применения следующих ароматизаторов: апельсинового (0,30–0,01%), малинового (0,30–0,01%), бананового (0,30–0,01%), кокосового (0,30–0,01%).

Установлено, что растительный вкус геля снижается в присутствии всех исследуемых ароматизаторов. При этом апельсиновый и банановый ароматизаторы маскируют горький привкус в концентрации 0,1%. Однако апельсиновый корригент придаёт ЛФ ярко выраженный цитрусовый аромат, в то время как аромат бананового ароматизатора выражен умеренно. По-

скольку умеренные вкусоароматические характеристики являются более предпочтительными для ЛС, в качестве ароматизатора для разрабатываемого геля выбран банановый.

Одной из основных задач при улучшении вкуса геля для приёма внутрь является выбор подсластителя. На сегодняшний день существует широкий ассортимент подсластителей и их комбинаций, составленных с учётом качественного и количественного синергизма степени сладости различных веществ [2, с. 67–70; 13, с. 54–55; 28, с. 159–161].

Были изучены коммерчески доступные смеси подсластителей, содержащие натрия сахаринат и натрия цикламат (смесь 1), натрия сахаринат, натрия цикламат и фруктозу (смесь 2), экстракт листьев стевии (смесь 3), инулин и сукралозу (смесь 4), эритриол, сукралозу и стевеозид (смесь 5).

Установлено, что добавление смесей 1 и 2 придаёт гелю сладкий вкус, не снижая или незначительно увеличивая при этом его горький привкус. Смеси 3 и 5 усиливали горький привкус и в различной мере растительный вкус геля, что, возможно, обусловлено присутствием в составе данных подсластителей растительного гликозида стевеозида. Смесь 4 придавала гелю сладкий вкус от выраженного до слабого, незначительно снижая при этом горькое послевкусие.

Таким образом, в качестве подсластителя выбрана смесь 4, содержащая сукралозу и инулин. Экспериментально подобранная концентрация – 0,12% – придаёт гелю умеренный сладкий вкус.

Комплексные вкусоароматические ощущения зависят от сочетания основных вкусов. Улучшение вкусовых характеристик геля может быть достигнуто при сочетании сладкого вкуса с кислым. В связи с этим целесообразно дополнительное введение вещества, обладающего кислым вкусом. С этой целью исследовали добавление лимонной кислоты, которая способна снижать горький вкус [5].

Оценивали выраженность кислого и сладкого вкусов геля при добавлении лимонной кислоты (таблица 3).

Таблица 3.

Влияние лимонной кислоты на выраженность кислого и сладкого вкусов гелевой композиции

Содержание лимонной кислоты, %	Вкусовой индекс геля
0,30	$K_3C_2\Gamma_2$
0,15	$K_3C_3\Gamma_2$
0,02	$K_2C_3\Gamma_2$

Таким образом, для введения в состав геля выбрана концентрация лимонной кислоты – 0,02%, обеспечивающая баланс кислого и сладкого вкусов.

Комплексный вкусоароматический профиль геля представлен на рисунке 3.



Рисунок 3. Профилограмма вкуса геля для приема внутрь «Ралитин»

Полученный гель представлял собой однородную прозрачную гелеобразную массу желто-оранжевого цвета. Гель обладал мягкой текстурой, ароматом банана, умеренными сладким, кислым и растительным вкусами с незначительным горьким послевкусием.

Значение pH 5% водного извлечения геля составило $4,6 \pm 0,2$. Следует отметить, что данное значение находится в пределах рабочего диапазона антимикробного действия кислоты сорбиновой на многие виды микроорганизмов [14, с. 133].

Представляло интерес изучить агрегативную устойчивость геля «Ралитин» как в условиях естественного хранения, так и при хранении в условиях повышенной температуры. Для этого определяли коэффициент кинетической устойчивости образцов гелей сразу после приготовления и после хранения в течение 7 суток; 1,5; 3 и 6 месяцев при температурах 20 и 40 °C. Установлено, что во всех случаях значения коэффициента кинетической устойчивости равны 0, таким образом, данная система остаётся устойчивой в изученных условиях.

Изучали реологические свойства геля «Ралитин». Определяли вязкость геля в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 200 c^{-1} и от 200 до 10 c^{-1} (рисунок 4).

При исследовании реологических характеристик установлено, что значения динамической вязкости геля после приложенного напряжения восстанавливались до исходных. Таким образом, исследованные структурно-механические свойства геля «Ралитин» свидетельствуют о возможности обеспечить его приемлемые потребительские свойства, удобство приёма, фасовку и транспортирование.

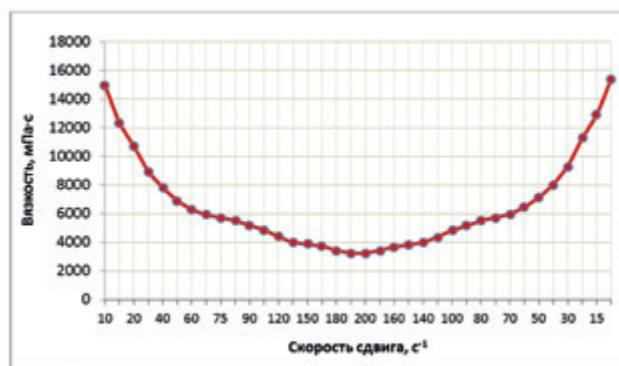


Рисунок 4. Кривая вязкости геля для приема внутрь «Ралитин»

При разработке пероральных ЛС важным критерием оценки свойств является тест «Растворение». Исследовали высвобождение суммы флавоноидов (%) в среду растворения. В ходе испытаний наблюдалось разрушение структуры геля: полное разрушение происходило в течение первых трёх минут с начала теста. Усреднённый профиль высвобождения геля «Ралитин» представлен на рисунке 5.

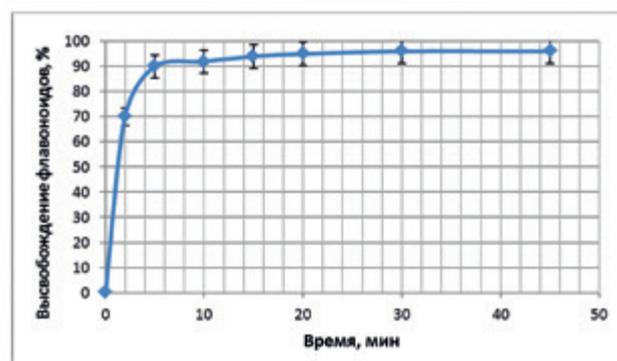


Рисунок 5. Усреднённый профиль высвобождения геля для приема внутрь «Ралитин»

Установлено, что в течение первых 5 минут из геля в среду растворения высвобождается около 90% суммы флавоноидов, поэтому можно считать, что выбранные вспомогательные вещества позволяют получить гель для приёма внутрь с приемлемыми биофармацевтическими свойствами *in vitro*.

Одним из ключевых вопросов разработки дисперсных систем, содержащих большое количество воды, является вопрос стабильности (в том числе микробиологической), точности дозирования и выбора первичной упаковки, обеспечивающей указанные свойства. Наиболее распространёнными видами упаковки гелей для приема внутрь являются саше и тубы [9, с. 47].

В качестве упаковки геля для приёма внутрь «Ралитин» использовали однодозовые саше, позволяю-

щие обеспечить точность дозирования ЛП в форме геля для приёма внутрь и микробиологическую стабильность при приёме в сравнении с многодозовыми.

Стабильность геля в процессе хранения изучали методом «ускоренного старения». Установлено, что полученный гель стабилен в течение всего экспериментального срока хранения (2 года). В настоящее время продолжают исследования стабильности геля при хранении в естественных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведен выбор вспомогательных веществ геля для приема внутрь «Ралитин» на основе извлечения из ромашки аптечной цветков: гелеобразователь – Na-КМЦ (Blanose™ 7 HF PH, Ashland), консервант – кислота сорбиновая («Вектон», Россия), корригенты: сукралоза с инулином (Nutrisun GmbH CoKG, Германия), ароматизатор банановый (Frontier® Co-op, США), кислота лимонная («Вектон», Россия).

Полученный гель обладает приемлемыми реологическими характеристиками, профилем высвобождения и органолептическими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Демина Н. Б. Разработка состава и технологии перорального пролонгированного геля нимесулида // Фармация. 2016. № 6. С. 30–34. [Anurova M. N., Bahrushina E. O., Demina N. B. Razrabotka sostava i tehnologii peroral'nogo prolongirovannogo gelja nimesulida // Farmacija. [Design of the composition and technology of long-acting oral nimesulide gel // Pharmacy.] 2016. № 6. P. 30–34].
2. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Демина Н. Б. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 13. С. 64–73. [Anurova M.N., Bahrushina E.O., Demina N.B. Problemy korrekcii organolepticheskikh svojstv lekarstvennykh preparatov // Razrabotka i registracija lekarstvennykh sredstv. [The problem of taste masking of drugs // Drug Development & Registration.] 2015. № 13. P. 64–73].
3. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Кречетов С. П. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 98–104. [Anurova M. N., Bahrushina E. O., Krechetov S. P. Izuchenie vlijaniya sostava kombinirovannoj matricy na reologicheskie harakteristiki jeksperimental'nyh obrazcov peroral'nyh gelej nimesulida // Razrabotka i registracija lekarstvennykh sredstv [Study of the matrix structure influence on the rheological characteristics of nimesulide oral gel experimental samples // Drug Development & Registration.] 2016. № 4 (17). P. 98–104].
4. Бахрушина Е. О., Анурова М. Н. Обоснование состава перорального пролонгированного геля ибупрофена на основе отечественного матрицеобразователя композиционного полимерного носителя // Здоровье и образование в XXI веке. [Bahrushina E. O., Anurova M. N. Obosnovanie sostava peroral'nogo prolongirovannogo gelja ibuprofena na osnove otechestvennogo matriceobrazovatelja kompozicionnogo polimernogo nositelja // Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke. [The development of the ibuprofen oral gel with plolonged release on the basis of composite delivery polymer polymer // Health and education in the twenty-first century.] 2016. V. 18. № 5. P. 117–120].
5. Вкусы и запахи – диссонанс и консонанс. [Vkusy i zapahi – dissonans i konsonans [Tastes and flovours – dissonance and consonance]. Available at: <http://foodinnovation.ru/articles/7921.html> (accessed 14.01.2018).
6. Государственный реестр лекарственных средств. [Gosudarstvennyj reestr lekarstvennykh sredstv [State register of medicines]. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/> (accessed 18.01.2018).
7. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 1. – М., 2015. С. 235–264. [OFS.1.1.0013.15. Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov himicheskogo jeksperimenta // Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izd. T. 1. [OFS.1.1.0013.15. Statistical processing of the results of a chemical experiment // State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. V. 1.] – М., 2015. P. 235–264].
8. Дмитрієвський Д. І., Нем'ятих О. Д., Осолодченко Т. П. Дослідження активності антимікробних консервантів у дитячому желе з ехінацеєю пурпуровою // Вісник фармації. 2010. № 3(63). С. 26–29. [Dmitrievskij D. I., Nemjatih O. D., Osolodchenko T. P. Doslidzhennja aktivnosti antimikrobnih konservantiv u ditjachomu zhele z ehinaceju purpurovoju // Visnik farmacii. [Research of the activity of antimicrobial preservatives in a jelly with echinacea purpurea for children // Bulletin of Pharmacy.] 2010. № 3(63). P. 26–29].
9. Загорулько Е. Ю., Теслев А. А. Гели для приема внутрь. Часть 1. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пище (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 3(20). С. 42–48. [Zagorul'ko E. Ju., Teslev A. A. Geli dlja priema vnutr'. Chast' 1. Lekarstvennye preparaty i biologicheski aktivnye dobavki k pishhe (obzor) // Razrabotka i registracija lekarstvennykh sredstv. [Gels for oral administration. Part 1. Medical products and dietary supplements (review) // Drug Development & Registration.] 2017. № 3(20). С. 42–48].
10. Загорулько Е. Ю., Теслев А. А. Гели для приема внутрь. Часть 2. Вспомогательные вещества (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 4(21). С. 34–43. [Zagorul'ko E. Ju., Teslev A.A. Geli dlja priema vnutr'. Chast' 2. Vspomogatel'nye veshhestva (obzor) // Razrabotka i registracija lekarstvennykh sredstv [Gels for oral administration. Part 2. Excipients (review) // Drug Development & Registration]. 2017. № 4(21). P. 34–43].
11. Загорулько Е. Ю., Теслев А. А., Ожигова М. Г. Разработка и оптимизация технологии ультразвукового экстрагирования ромашки аптечной цветков (*Chamomillae recutita* flores) // Фармация и фармакология. 2018. № 6(2). С. 151–166. [Zagorul'ko E. Ju., Teslev A. A., Ozhigova M. G. Razrabotka i optimizacija tehnologii ul'trazvukovogo jekstragirovanija romashki aptechnoj cvetkov (*Chamomillae recutita* flores) // Farmacija i farmakologija. [Development and optimization of ultrasound extraction of the chamomile flowers (*Chamomillae recutita* flores) // Pharmacy & Pharmacology]. 2018. № 6(2). С. 151–166].
12. Запорожська С. М., Баранова І. І., Грубник І. М. Розробка складу і технології вітамінного гелю для дітей // Вісник фармації. Технологія лікарських препаратів. 2009. № 1(59). С. 27–29. [Zaporozhs'ka S. M., Baranova I. I., Grubnik I. M. Rozrobka skladu i tehnologii vitaminного gelju dlja ditej // Visnik farmacii.

- Tehnologija likars'kih preparativ. [Development of the composition and technology of vitamin gel for children // Bulletin of pharmacy.] 2009. № 1(59). С. 27–29].
13. Кузнецов А. В., Кузнецов А. А. Корригенты вкуса в производстве лекарственных препаратов // Фармация. 2011. № 2. С. 53–56. [Kuznecov A. V., Kuznecov A. A. Korrigenty vkusa v proizvodstve lekarstvennyh preparatov // Farmacija. [Taste corrigents in the manufacture of drugs // Pharmacy.] 2011. № 2. P. 53–56].
 14. Люк Э., Ягер М. Консерванты в пищевой промышленности. Свойства и применение / Пер. с нем. 3-е изд. – СПб.: ГИОРД, 2003. С. 127–133. [Ljuk Je., Jager M. Konservanty v pishhevoj promyshlennosti. Svojstva i primeneniye / Per. s nem. 3-e izd. [Preservatives in the food industry. Properties and applications. 3rd edition.] – SPb.: GIORД, 2003. P. 127–133].
 15. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в новых независимых государствах. Всемирная организация здравоохранения, 2010. [Monografii VOZ o lekarstvennyh rastenijah, shiroko ispol'zuemyh v novyh nezavisimyh gosudarstvah. Vsemirnaja organizacija zdavoohranenija, 2010. Available at: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17534ru/s17534ru.pdf#page=71> (accessed 22.02.2018).
 16. Муса В., Зирко А., Дёмин М. Полимеры Carbopol™ в качестве функциональных гелеобразователей // Фармацевтические технологии и упаковка. 2017. № 2. С. 30–33. [Musa B., Zirko A., Djomin M. Polimery Carbopol™ v kachestve funkcional'nyh geleobrazovatelej // Farmaceuticheskie tehnologii i upakovka. [Carbopol™ polymers as functional gellants // Pharmaceutical technologies and packaging.] 2017. № 2. С. 30–33].
 17. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая управления). [Reestr produkcii, proshedshej gosudarstvennuju registraciju (vydannye Federal'noj sluzhboj, vkljuchaja upravlenija) [The register of products that have passed state registration (issued by the Federal Service, including the Office)]. Available at: <http://fp.crc.ru/gosregfr/?type=list> (accessed 20.01.2018).
 18. Сычева О. В., Коноплев В. И., Веселова М. В. Повышение точности органолептической оценки // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 79–80. [Sycheva O. V., Konoplev V. I., Veselova M. V. Povysheniye tochnosti organolepticheskoy ocenki // Dostizheniya nauki i tehniki APK. [Increase in the accuracy of organoleptic evaluation // Achievements of science and technology of the agroindustrial complex.] 2010. № 12. P. 79–80].
 19. Тенцова А. И., Ажгихин И. С. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств (введение в биофармацию). – М. Медицина, 1974. 335 с. [Tencova A. I., Azhghihin I. S. Lekarstvennaja forma i terapevticheskaja jeffektivnost' lekarstv (vvedeniye v biofarmaciju) [Dosage form and therapeutic efficacy of drugs (introduction to biopharmaceutics).] – M.: Medicina, 1974. 335 p.].
 20. Тенцова А. И., Алжухин М. Т. Полимеры в фармации. – М.: Медицина, 1985. 256 с. [Tencova A. I., Aljushin M. T. Polimery v farmacii. [Polymers in pharmacy.] – M.: Medicina. 1985. 256 p.].
 21. Тенцова А. И., Грецкий В. М. Современные аспекты исследования и производства мазей. – М.: Медицина, 1980. 192 с. [Tencova A. I., Greckij V. M. Sovremennyye aspekty issledovaniya i proizvodstva mazej. [Modern aspects of research and production of ointments.] – M.: Medicina. 1980. 192 p.].
 22. Усенбаева Б., Иванова Л. А., Прянишников Н. Т. и др. Лекарственная форма тримекаина и пиромекаина на основе водных гелей натрий-карбоксиметилцеллюлозы // Фармация. 1985. № 6. С. 29–32. [Usenbaeva B., Ivanova L. A., Prjanishnikova N. T. i dr. Lekarstvennaja forma trimekaina i piromekaina na osnove vodnyh gelej natrij-karboksimetilcelljulozy // Farmacija. [Dosage form of trimecaine and pyromecaine based on aqueous sodium-carboxymethylcellulose gels // Pharmacy.] 1985. № 6. P. 29–32].
 23. Чуешов В. И. Промышленная технология лекарств. Т. 2. Харьков: МТК-Книга; НФАУ. 2002. 716 с. [Chueshov V. I. Promyshlennaja tehnologija lekarstv. Tom 2. [Industrial technology of medicines. V. 2.] – Harkov: MTK-Kniga; NFAU. 2002. 716 p.].
 24. Chamomile. Kooperation Phytopharmaka. Available at: <http://www.koop-phyto.org/en/medicinal-plants/chamomile.php> (accessed 22.02.2018).
 25. Fleming T. Physician's Desk Reference for Herbal Medicines. – Montvale: Medical Economics Company, 2000. 858 p.
 26. Franke R., Schilcher H. Chamomile. Industrial Profiles. – Florida: CRC Press, 2005. 279 p.
 27. Harrington E. C. The desirability function // Industrial Quality Control. 1965. V. 21. № 10. P. 494–498.
 28. Katdare A., Chaubal M. V. Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems. – New York, London: Informa Healthcare USA, 2006. 452 p.
 29. Moschakis T. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2013. V. 18. P. 311–323.
 30. Nazir A., Asghar A., Aslam Maan A. Advances in Food Rheology and its Applications. Chapter 13. Food Gels: Gelling Process and New Applications. 2017. P. 335–353.
 31. Phillips G. O., Williams P. A. Handbook of Hydrocolloids, 2nd ed. – UK: Woodhead Publishing, 2009. 948 p.
 32. Satyanarayana D. A., Kulkarni P. K., Shivakumar H. G. Gels and jellies as a dosage form for dysphagia patients: a review // Current Drug Therapy. 2011. V. 6. P. 79–86.
 33. Shayne Cox Gad. Pharmaceutical Manufacturing Handbook. Production and Processes. – New Jersey: John Wiley & Sons. 2008. 1370 p.



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 ампулы, 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!**



УДК 615.1; 615.45; 615.07

ИЗУЧЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ

М. Н. Анурова¹, Е. О. Бахрушина¹, И. В. Лапик¹, А. С. Шитова^{1*}, И. И. Краснюк¹

Резюме. В статье приведены результаты изучения осмотической активности экспериментальных образцов офтальмологических гелей даларгина и эмоксипина на основе различных полимеров, а также ряда зарегистрированных на территории Российской Федерации офтальмологических гелей. На основе сравнительного изучения осмотической активности гелей Видисик®, Солкосерил®, Корнерегель® и Офтагель®, а также 0,9% раствора натрия хлорида, используемого как эталон осмолярности, был обоснован выбор наиболее перспективных для дальнейшего изучения экспериментальных составов гелей эмоксипина и даларгина. Было показано, что оптимальными значениями осмотической активности среди анализируемых образцов обладает экспериментальный образец офтальмологического геля эмоксипина с содержанием Natrosol™ 250NHX в концентрации 1, а также гели Офтагель® и Солкосерил®.

Ключевые слова: глазные гели, осмотическая активность, диализ, эмоксипин, даларгин.

THE STUDY OF THE OSMOTIC ACTIVITY OF OPHTHALMIC GELS

M. N. Anurova¹, E. O. Bakhrushina¹, I. V. Lapik¹, A. S. Shitova^{1*}, I. I. Krasnyuk¹

Abstract. Studies of the osmotic activity of emoxypine and dalargin ophthalmic experimental gels samples based on various polymers and also studies of some marketed in Russia ophthalmic gels are presented in the article. Selection of the most promising for further study emoxypine and dalargin experimental gel compositions was based on the comparative study of Vidisic®, Solcoseryl®, Corneregel®, Oftagel® ophthalmic gels as well as 0,9% sodium chloride solution used as the standard of osmolality. Optimal values of osmotic activity have an experimental sample of an emoxypine ophthalmic gel containing Natrosol™ 250NHX at a concentration of 1%, as well as Oftagel® and Solcoseryl® gels.

Keywords: ophthalmic gels, osmotic activity, dialysis, emoxypine, dalargin.

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

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: good.ann@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире офтальмологические заболевания имеют отрицательную статистику, поэтому в настоящее время большое внимание уделяется разработке современных лекарственных форм для рационального местного лечения различных заболеваний глаз. Одной из основных проблем, требующих решения, является проблема низкой биодоступности лекарственных субстанций после нанесения на глазное яблоко. Статические, динамические и метаболические барьеры глаза создают препятствия для местного применения офтальмологических лекарственных форм. Это вызвано, в частности, сложной анатомической структурой глаза, малой абсорбирующей поверхностью, низкой проницаемостью и липофильностью эпителия роговицы, метаболизмом, ферментализмом, связыванием препарата белками слезной жидкости и защитными механизмами, такими как моргание, образование слез и отток жидкости через носоглоточный канал [21, 838; 20, 10; 18, 1197]. Малый объем конъюнктивального

мешка и различные защитные механизмы приводят к уменьшению концентрации лекарственного вещества в месте нанесения и времени контакта препарата с абсорбирующей поверхностью [22, 668].

Современные офтальмологические лекарственные формы, к которым относятся в том числе и гели, обладают рядом преимуществ перед традиционными формами, такими как капли. Они имеют большую биодоступность, в частности, за счет уменьшения чувствительности лекарственной формы к защитным механизмам глаза, увеличения времени контакта препарата с роговицей, увеличения способности препарата проникать через сложную анатомическую структуру глаза, а также обеспечения контролируемого высвобождения, что позволяет уменьшить частоту применения [17]. Глазные гели, кроме того, могут наноситься как на роговицу глаза, так и на веки. Применение глазных гелей не только способно повысить приверженность терапии, но и является потенциально более безопасным с точ-

ки зрения развития микробной контаминации препарата и последующих бактериальных инфекций глаза. В исследованиях А. J. Tatham с соавторами было показано, что множественные ошибки, допускаемые пациентами при самостоятельной инстилляции жидких лекарственных форм для офтальмологического применения, в 42,4% случаев приводили ко вторичной микробной контаминации и развитию бактериальных инфекций. В то же время в экспериментах М. Krilis и М. Соропео показано, что риск микробной контаминации в случае введения лекарственной формы с помощью указательного пальца ведущей руки снижается [19, 203; 23, 1297].

Государственная фармакопея XIII издания не требует определения осмотической активности мягких лекарственных форм для офтальмологического применения, нормируя только осмолярность и pH лекарственных форм [10, 121]. Однако зачастую при разработке новых лекарственных форм осмотическая активность фигурирует как необходимый биофармацевтический тест для обоснованного выбора основы [13, 7–10; 2, 46–47; 12, 367; 9, 139; 5, 3–4; 16, 142; 7, 22].

Осмотическая активность является значимым показателем лекарственных форм, наносимых как на кожу, так и на слизистые оболочки [2, 46–47; 5, 3–4; 7, 22]. Если при нанесении мазей или гелей на рану, характеризующуюся экссудативными выделениями, высокая осмотическая активность является желаемым показателем лекарственной формы, так как она обеспечивает отток гнойно-раневого содержимого, ликвидирует тканевую гипертонию и воспалительный отек и т.д., то при нанесении на глазное яблоко высокая осмотическая активность лекарственной формы приводит к дегидратации слизистой оболочки. Близость величины осмотической активности офтальмологического геля к осмолярности слезной жидкости свидетельствует о безопасности применения изучаемого геля в офтальмологической практике [15, 62]. При этом необходимо принимать во внимание, что более низкая осмотическая активность по отношению к эпителию роговицы улучшает качество офтальмологических гелей, поскольку гипотонический раствор оказывает лучший эффект на эпителий по сравнению с изотоническим [3, 36].

Значимый вклад в величину осмотической активности вносят катионные или анионные вспомогательные вещества в составе лекарственной формы, однако большую роль играет также природа и количество действующих веществ [4, 150]. В ходе экспериментальных исследований были достоверно определены величины осмотической активности ряда фармацевтических эксципиентов и показано, что величина осмотической активности не всегда линейно зависит от их концентрации [13, 7–10; 2, 46–47; 12, 368; 9, 139; 5, 3–4; 16, 142; 7, 22; 15, 62; 14].

Для определения осмотической активности используются как инструментальные аналитические методы (определение с помощью осмометра), так и наиболее распространенный ввиду своей простоты и воспроизводимости гравиметрический метод определения данного показателя диализом через полупроницаемую мембрану [13, 7–10]. Существует два варианта определения величины осмотической активности равновесным диализом: без сравнения со стандартным образцом и с использованием в качестве стандарта воды очищенной или физиологического раствора. Существенное влияние на получаемые в ходе исследования данные оказывает тип диализной мембраны, используемой в эксперименте. Диализные мембраны различают по составу (целлюлозные или синтетические), размеру пор (от 1,0 до 30 кДа), а также электрическому заряду [8, 36–37; 11, 288].

В настоящее время результаты определения осмотической активности используются для обоснования выбора основ в процессе разработки новых лекарственных форм. Ввиду многофакторного воздействия вариабельности на результаты эксперимента не могут быть получены универсальные оптимумы осмотической активности и, следовательно, разработаны единые требования по данному показателю.

Даларгин и эмоксипин являются отечественными активными фармацевтическими субстанциями, перспективными для использования в офтальмологической практике различных заболеваний. Разработка новых лекарственных форм на основе этих лекарственных веществ представляет актуальную проблему в рамках реализации стратегии «Фарма-2020». В ходе ранее проведенных исследований по разработке состава и технологии офтальмологических гелей эмоксипина и даларгина [14; 1, 117–119] были получены стабильные экспериментальные образцы на различных типах гелеобразователей.

Целью данной работы является определение осмотической активности экспериментальных составов офтальмологических гелей эмоксипина и даларгина и ее сравнение с данными определения осмотической активности глазных гелей, выпускаемых фармацевтической промышленностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: экспериментальные образцы офтальмологических гелей эмоксипина и даларгина, разработанные на базе лаборатории кафедры фармацевтической технологии Сеченовского Университета (таблица 1), удовлетворяющие требованиям ОФС.1.4.1.0003.15 «Глазные лекарственные формы» и ОФС.1.4.1.0008.15 «Мази», а также лекарственные препараты в форме глазных гелей, зарегистрированные на территории РФ (таблица 2). Всего на российском фармацевтическом рынке присутствуют шесть лекарственных препаратов в форме офтальмологичес-

ких гелей [6]. Для эксперимента были выбраны четыре препарата, так как оставшиеся два имеют схожий состав и, предположительно, не будут демонстрировать значимых различий величины осмотической активности [2, 46–47].

Таблица 1.

Составы гелей, полученных в лабораторных условиях

Компонент	Состав					
	1	2	3	4	5	6
Эмоксипин, г	1,0	1,0	1,0	–	–	–
Даларгин, г	–	–	–	0,044	0,044	0,044
Натрия сульфит, г	0,1	0,1	0,1	–	–	–
Натрия гидрофосфат, г	0,5	0,5	0,5	–	–	–
Натрия бензоат, г	0,5	0,5	0,5	–	–	–
0,2 М раствор хлористоводородной кислоты, мл	22	22	22	–	–	–
Natrosol™ 250NHX, г	1,0	1,25	1,5	–	–	–
Natrosol™ 250G, г	–	–	–	1,25	1,5	–
Natrosol™ 250H, г	–	–	–	–	–	1,25
Натрия хлорид	–	–	–	0,58	0,58	0,58
Натрия ацетата тригидрат	–	–	–	0,2	0,2	0,2
ЭДТА	–	–	–	0,0058	0,0058	0,0058
Бензалкония хлорид, г	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Вода очищенная	До 100,0 г					

Таблица 2.

Составы офтальмологических гелей промышленного производства

Название	Производитель	Состав
Офтагель®	«Урсафарм Арцнаймиттель ГмБХ», Германия	Бензалкония хлорид Сорбитол Лизина моногидрат Натрия ацетат Поливиниловый спирт Карбомер 974Р Вода для инъекций
Солкосерил®	«Меда Фарма ГмБХ», Австрия	Солкосерил Бензалкония хлорид Кармеллоза натрия, 13 мг Динатрия эдетата дигидрат, 1,0 мг Сорбитол 70%, 50 мг Вода для инъекций, до 1,0 г
Видисик®	«Др. Герхард Манн химико–фармацевтическое предприятие ГмБХ», Германия	Цетримид Карбомер Сорбитол Натрия гидроксид Вода для инъекций до 1,0 г
Корнерегель®	«Др. Герхард Манн химико – фармацевтическое предприятие ГмБХ», Германия	Дексапантенол Цетримид Динатрия эдетат Карбомер Натрия гидроксид Вода для инъекций

Осмотические свойства офтальмологических гелей изучали методом равновесного диализа на приборе, состоящем из стеклянной трубки диаметром 30–35 мм, один конец которой затянута диализной пленкой OrDialD14b с размером пор 12–14 кДа (Orange Scientific, Бельгия), по рекомендации производителя предварительно замоченной на 15 минут в воде очищенной. Навеску геля массой около 2 г наносили на внутреннюю поверхность пленки, затем помещали в сосуд с водой очищенной на 2–3 мм и термостатировали в суховоздушном термостате ТС-80М-2 (АО «Медлабортехника», Украина) при температуре 37 °С в течение 24 часов. Через 1 час и через 24 часа после начала эксперимента диализную трубку вынимали и взвешивали с точностью до 0,01 г. Увеличение или уменьшение массы трубки свидетельствовало о количестве поглощенной или отданной гелем жидкости по сравнению с первоначальной массой [13, 7–10]. Величину осмотической активности оценивали гравиметрически и выражали в процентах по отношению к первоначальной массе геля. Параллельно в аналогичных условиях проводили контрольный опыт с 0,9% раствором натрия хлорида [16, 142]. Величину осмотической активности рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{(M_i - M_0)}{m} \times 100\%,$$

где P – осмотическая активность, %; M_0 – масса диализного блока до термостатирования, г; M_i – масса диализного блока через определенный промежуток времени после начала термостатирования, г; m – масса навески, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований была определена осмотическая активность при измерении спустя 1 час и 24 часа эксперимента для шести экспериментальных образцов, четырех гелей промышленного производства и физиологического раствора, используемого в качестве эталона. Результаты представлены в таблице 3.

На рисунке 1 приведены графики, иллюстрирующие изменения величины осмотической активности экспериментальных образцов 1–6 за 24 часа проведения эксперимента. Как видно из данных таблицы 1 и рисунка 1, наибольшей осмотической активностью после 24 часов наблюдений обладает образец 6, наименьшей – образец 2. В координатах зависимости осмотической активности в процентах от времени был построен диапазон величин осмотической активности для гелей промышленного производства для сравнения с ними экспериментальных образцов. Показано, что составы 1, 2, 3, 4 и 6 лежат в пределах данного диапазона значений осмотичности, а прямая осмотической активности состава пять находится выше границ данного диапазона, что свидетельствует о его гиперосмолярности.

Таблица 3.

Осмотическая активность офтальмологических гелей

№ п/п	Состав геля	Осмотическая активность, %	
		1 ч	24 ч
Эталон	0,9% раствор натрия хлорида	62,58±3,0%	456,22±5,0%
1	Эмоксипин 1% + Natrosol™ 250ННХ 1%	17,41±3,0%	211,27±5,0%
2	Эмоксипин 1% + Natrosol™ 250ННХ 1,25%	159,4±3,0%	165,84±5,0%
3	Эмоксипин 1% + Natrosol™ 250ННХ 1,5%	211,3±3,0%	278,9±5,0%
4	Даларгин 0,044% + Natrosol™ 250Н 1,25%	154,1±3,0%	300,98±5,0%
5	Даларгин 0,044% + Natrosol™ 250G 1,25%	265,5±3,0%	347,78±5,0%
6	Даларгин 0,044% + Natrosol™ 250G 1,5%	154,7±3,0%	190,5±5,0%
7	Офтагель®	35,3±3,0%	117,5±5,0%
8	Солкосерил®	60,3±3,0%	137,25±5,0%
9	Видисик®	165,67±3,0%	298,51±5,0%
10	Корнерегель®	76,7±3,0%	319,41±5,0%

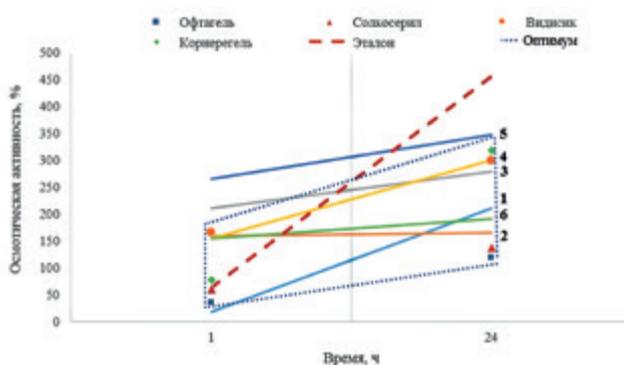


Рисунок 1. Графическая интерпретация результатов определения осмотической активности экспериментальных образцов 1–6, эталонного раствора 0,9% натрия хлорида и офтальмологических гелей промышленного производства

Было показано, что в первый час измерений ряд анализируемых образцов, в том числе и гели заводского производства Видисик® и Корнерегель®, демонстрируют осмотическую активность выше, чем 0,9% раствор натрия хлорида, то есть являются гиперосмолярными. Известно, что гиперосмолярность офтальмологических лекарственных форм может вызывать неприятные ощущения при инстилляции и в целом уменьшает комплаентность терапии этими препаратами [21, 838; 20, 10; 18, 1197].

Таким образом, оптимальными значениями осмотической активности обладает экспериментальный образец офтальмологического геля эмоксипина с содержанием Natrosol™ 250ННХ в концентрации 1% (образец 1), а также гели Офтагель® и Солкосерил®.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для корректной оценки осмотических характеристик офтальмологических лекарственных форм важнейшим критерием является проведение контрольного опыта с эталонным раствором (0,9% раствором натрия хлорида), позволяющее достоверно оценивать сравнительную осмолярность исследуемых образцов.

Оптимальными значениями осмотической активности обладает образец, содержащий эмоксипин в концентрации 1% и Natrosol™ 250ННХ в концентрации 1%. Экспериментальные образцы гелей даларгина (образцы 4, 5 и 6) являются гиперосмотическими, что указывает на необходимость коррекции их составов для улучшения биофармацевтических и потребительских характеристик.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анурова М. Н., Лапик И. В., Бахрушина Е. О., Кречетов С. П., Краснюк И. И. Технологические аспекты фармацевтической разработки офтальмологического геля эмоксипина // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. № 4. С. 117–123. [Anurova M. N., Lapik I. V., Bakhrushina E. O., Krechetov S. P., Krasnyuk I. I. Tekhnologicheskie aspekty farmaceuticheskoy razrabotki oftalmologicheskogo gelya ehmoxipina // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmatsiya. 2017. № 4. P. 117–123.]
2. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Кречетов С. П. Современные аспекты создания глазных лекарственных форм: определение реологических оптимумов офтальмологических гелей // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 4(21) С. 46–52. [Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Krechetov S. P. Sovremennye aspekty sozdaniya glaznyh lekarstvennyh form: opredelenie reologicheskikh optimumov oftalmologicheskikh gelej // Razrabotka i registratsiya lekarstvennyh sredstv. 2017. № 4(21) С. 46–52.]
3. Блатун Л. А. Банеоцин® (порошок, мазь) – перспективы использования в комплексном хирургическом лечении гнойно-некротических поражений нижних конечностей у больных с синдромом диабетической стопы // Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б. М. Костюченко. 2015. Т. 2. № 3. С. 36–45. [Blatun L. A. Baneocin® (poroshok, maz') – perspektivy ispol'zovaniya v kompleksnom hirurgicheskom lechenii gnojno-nekroticheskikh porazhenij nizhnih konechnostej u bol'nyh s sindromom diabeticheskoy stopy // Rany i ranevye infekcii. Zhurnal imeni professora B.M. Kostyuchenka. 2015. T. 2. № 3. P. 36–45.]
4. Волков А. А., Пантелеев Д. А., Мельникова Н. Б. Новые гидрофильные гели на основе репаранта Ксимедон // Медицинский альманах. 2009. № 3(8). С. 150–152. [Volkov A. A., Panteleev D. A., Mel'nikova N.B. Novye gidrofil'nye geli na osnove reparanta Ksimedon // Medicinskij al'manah. 2009. № 3(8). P. 150–152.]

5. *Врынчану Н. А., Шаламай А. С.* Осмотическая активность мази на основе производного аминоадамантиана // Вопросы экологии и медицины. 2007. Т. 11. № 5–6. С. 3–4. [Vrynchanu N. A., Shalamaj A. S. Osmoticheskaya aktivnost' mazi na osnove proizvodnogo aminoadamantana // Voprosy ehkologii i mediciny. [Osmotic activity of the ointment on the base of adamantane derivative // Voprosy ehkologii i mediciny.] 2007. T. 11. № 5–6. P. 3–4.]
6. Государственный реестр лекарственных средств. [Gosudarstvennyy reestr lekarstvennyh sredstv. [State register of medicines]. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (accessed 12.04.2018).
7. *Демина Н. Б., Анурова М. Н., Бахрушина Е. О.* Мягкие лекарственные формы фурацилина: влияние типа лекарственной формы и вспомогательных веществ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 5(5). С. 22–28. [Demina N. B., Anurova M. N., Bakhrushina E. O. Myagkie lekarstvennyye formy furacilina: vliyanie tipa lekarstvennoy formy i vspomogatel'nyh veshchestv // Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv. [Soft dosage forms of furacilin: influence of the type bases and excipients // Drug Development & Registration.] 2013. № 5(5). P. 22–28.]
8. *Каграманов Г. Г.* Диффузные мембранные процессы / Учебное пособие. М. РХТУ им. Менделеева, 2009. 73 с. [Kagramanov G. G. Diffuznye membrannyye processy / Uchebnoye posobie. [Diffuse membrane processes / Textbook.] M. RHTU im. Mendeleeva, 2009. 73 p.]
9. *Кильдияров Ф. Х., Катаев В. А., Фаттахов И. Я.* Изучение осмотической активности и распадаемости стоматологических штифтов на основе сополимера стирола с maleиновым ангидридом и метронидазолом // Медицинский вестник Башкортостана. 2009. Т. 4. № 2. С. 139–141. [Kil'diyarov F. H., Kataev V. A., Fattahov I. YA. Izuchenie osmoticheskoy aktivnosti i raspadaemosti stomatologicheskikh shtiftov na osnove sopolimera stirola s maleinovym ангидридом и metronidazolom // Medicinskij vestnik Bashkortostana. [The studying of osmotic activity and disintegration of medical dental pins based on styrole copolymer combined with malein anhydride and metronidazole // Medicinskij vestnik Bashkortostana.] 2009. T. 4. № 2. P. 139–141.]
10. *Лапик И. В., Анурова М. Н., Кречетов С. П.* Разработка методик определения показателей качества офтальмологического геля эмоксипина // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18. № 5. С. 121–125. [Lapik I. V., Anurova M. N., Krechetov S. P. Razrabotka metodik opredeleniya pokazatelej kachestva oftalmologicheskogo gelya ehmoksipina // Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke. [Investigation of the test parameters for emoxipine ophthalmic gel // Health & Education millennium.] 2016. T. 18. № 5. P. 121–125.]
11. *Лукоянов И. А.* Величина концентрации основного действующего вещества в растворе лекарственного средства как дефектный показатель качества // Здоровье и образование в XXI веке. 2014. Т. 16. № 4. С. 288–290. [Lukoyanov I. A. Velichina koncentracii osnovnogo dejstvuyushchego veshchestva v rastvore lekarstvennogo sredstva kak defektnyj pokazatel' kachestva // Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke. [The value of the concentration of the main active substances in the solution of the medicinal product as defective quality score // Health & Education millennium.] 2014. T. 16. № 4. P. 288–290.]
12. *Манджигаладзе Т. Ю., Романцова Н. А.* Определение осмотической активности исследуемых мазей с экстрактами Робинии и Солодки // Материалы XII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва, с. 367. [Mandzhigoladze T. Yu., Romancova N. A. Opredelenie osmoticheskoy aktivnosti issleduemyh mazej s ehkstraktami Robinii i Solodki // Materialy XII mezhdunarodnogo kongressa «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke» RUDN, Moskva. [Determination of osmotic activity of ointments with extracts from Robinia and Solodka // Materials of the 12th International Congress "Health and Education in the 21st Century" Peoples' Friendship University of Russia, Moscow.] P. 367.]
13. *Перцев И. М., Беркало Н. Н., Гуторов С. А., Постольник В. В.* Значение осмотических свойств мазей при их использовании в медицинской практике // Вестник фармации. 2002. № 2(30). С. 7–10. [Percev I. M., Berkalo N. N., Gutorov S. A., Postol'nik V. V. Znachenie osmoticheskikh svojstv mazej pri ih ispol'zovanii v medicinskoj praktike // Vestnik farmacii. [Value osmotic properties of ointments when its used in medical practice // Bulletin of Pharmacy.] 2002. № 2(30). P. 7–10.]
14. Патент RU: А61К9/00, А61К31/513. Офтальмологический гель и способ его приготовления / Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. К. Яшнова, Н. Б. Мельникова, О. В. Кольчик, М. С. Гусихина. – Заявл. 03.05.2007; опубл. 10.12.2008. [Patent RU: А61К9/00, А61К31/513. Oftalmologicheskij gel i sposob ego prigotovleniya. [Ophthalmic gel and the way of its preparation] / L. D. Rasnecov, Y. U. Shvarcman, O. K. Yashnova, N. B. Melnikova, O. V. Kolchik, M. S. Gusihina. – Zajavl. 03.05.2007; opubl. 10.12.2008.]
15. *Сысуйев Б. Б., Спасов А. А., Митрофанова И. Ю.* Обоснование возможности использования офтальмологического спрея бисхофита и кислоты глицирризиновой при гнойных инфекциях глаз // Вестник волгоградского государственного медицинского университета. 2011. № 1(17). С. 62–65. [Sysuev B. B., Spasov A. A., Mitrofanova I. Yu. Obosnovanie vozmozhnosti ispol'zovaniya oftalmologicheskogo spreya bishofita i kisloty glicirrizinovoj pri gnojnyh infekcijah glaz // Vestnik volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. [Justification of the possibility of using bischofite ophthalmic spray and glycyrrhizic acid in purulent eye infections // Bulletin of Volgograd State Medical University.] 2011. № 1(17). P. 62–65.]
16. *Тихонов А. И., Михайленко В. В.* Изучение влияния ряда неводных растворителей на осмотические свойства комбинированного геля противовоспалительного действия // Запорожский медицинский журнал. 2008. № 4(49). С. 142–144. [Tihonov A. I., Mihajlenko V. V. Izuchenie vliyaniya ryada nevodnyh rastvoritelej na osmoticheskie svojstva kombinirovannogo gelya protivovospalitel'nogo dejstviya // Zaporozhskij medicinskij zhurnal. [Study of the effect of a number of non-aqueous solvents on the osmotic properties of the combined anti-inflammatory gel // Zaporozhye Medical Journal.] 2008. № 4(49). P. 142–144.]
17. *Baranowski P., Karolewicz B., Gajda M., Pluta J.* Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods // Scientific World Journal. 2014. doi: 10.1155/2014/861904 PMID: PMC3977496.
18. *Gaudana R., Jwala J., Boddu S. H. S., Mitra A. K.* Recent perspectives in ocular drug delivery // Pharmaceutical Research. 2009. № 26(5). P. 1197–1216.
19. *Krillis M., Coroneo M.* Digital eye drop instillation – a novel method // Aust. Fam. Physician. 2013. V. 4. № 2(4). P. 201–202.
20. *Nisha S., Deepak K.* An insight to ophthalmic drug delivery system // International Journal of Pharmaceutical Studies Research. 2012. № 3(2). P. 9–13.
21. *Pahuja P., S. Arora S., Pawar P.* Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers // Expert Opinion on Drug Delivery. 2012. № 9(7). P. 837–861.
22. *Rajasekara A., Kumaran K. S. G. A., Preetha J. P., Karthika K.* A comparative review on conventional and advanced ocular drug delivery formulations // International Journal of PharmTech Research. 2010. № 2(1). P. 668–674.
23. *Tatham A. J., Sarodia U., Gatrad F., Awan A.* Eye drop instillation technique in patients with glaucoma // Eye (Lond). 2013. V. 27. № 11. P. 1293–1298.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
КОНГРЕССНО-
ВЫСТАВОЧНЫЙ
ЦЕНТР
ЭКСПОФОРУМ

17-19
ОКТАБРЯ
2018



ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ:



МЕДИЦИНСКОЕ
ОБОРУДОВАНИЕ



IT В МЕДИЦИНЕ



ФИЗИОТЕРАПИЯ
И РЕАБИЛИТАЦИЯ



РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ,
МЕДИЦИНСКАЯ
СПЕЦОДЕЖДА



ИННОВАЦИОННЫЕ
РАЗРАБОТКИ



ОСНАЩЕНИЕ
МЕДИЦИНСКИХ ЦЕНТРОВ



ФАРМАЦИЯ



МЕДИЦИНСКИЕ ЦЕНТРЫ.
САНАТОРИИ

ОРГАНИЗАТОР

EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
МЕДИАПАРТНЁР



СПОНСОР



PMFZ.EXPOFORUM.RU



12+

УДК 615.4; 544.77.022; 544.77.023.5; 544.77.03

ХАРАКТЕРИСТИКА И ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

М. В. Дмитриева^{1*}, Т. А. Тимофеева², Н. А. Оборотова^{1,2}, И. И. Краснюк²,
О. И. Степанова²

Резюме. Основной целью фармацевтической технологии является максимальное использование «фармацевтических факторов» для обеспечения высокого качестваготавливаемых лекарственных средств, что совпадает со стратегической задачей биофармации, которая заключается в максимальном повышении эффективности лекарственных средств и снижении до минимума возможного нежелательного их действия на организм. Согласно биофармацевтическим исследованиям лекарственная форма существенно влияет на действие включенного в нее лекарственного вещества. В последние десятилетия значительная часть научных исследований в области фармации посвящена созданию лекарственных форм на основе направленных систем доставки диагностических и лекарственных веществ, среди которых наибольшую популярность завоевали липосомы. Липосомы рассматриваются как перспективные системы доставки препаратов в кровяное русло благодаря своим коллоидным свойствам, контролируемым размерам, поверхностным характеристикам, мембранотропности и биосовместимости. Однако коллоидные дисперсные системы являются термодинамически неустойчивыми, поэтому несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомальных препаратов представляет характеристика и оценка стабильности полученного продукта. С этой целью, как правило, используют 3 основных показателя – размер везикул, индекс полидисперсности и дзета-потенциал. Размер липосом является одним из основных показателей качества липосомального препарата, который в основном зависит от его компонентного состава и технологии получения. Дисперсность липосом в значительной степени влияет на скорость элиминации и характер распределения лекарственного вещества, концентрацию в биологических жидкостях и тканях, а также определяет механизм интернализации клеток. Поскольку в большинстве макромолекулярных и нанодисперсных систем молекулы и частицы неодинаковы, при описании свойств систем необходимо использовать функции распределения частиц по их параметрам, то есть при исследовании реальных систем учитывать их полидисперсность, так как монодисперсные приближения могут приводить к неверным заключениям о свойствах частиц. Ширину распределения частиц по размерам характеризуют по индексу полидисперсности. ζ -потенциал является важным индикатором поверхностного заряда частиц и мерой электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами, а также одним из основных параметров, влияющих на стабильность дисперсных систем. Липосомы с высоким отрицательным или положительным ζ -потенциалом отталкиваются друг от друга и остаются монодисперсными и стабильными, а с низким ζ -потенциалом способны объединяться, агрегировать и образовывать нестабильные составы. Кроме того, этот параметр также позволяет предсказать взаимодействие липосом и клеток.

Ключевые слова: фармацевтические факторы, лекарственная форма, липосомы, липосомальная дисперсия, стабильность, дзета-потенциал, размеры липосом, индекс полидисперсности.

CHARACTERISTICS AND STABILITY ASSESSMENT OF LIPOSOMAL PREPARATIONS

M. V. Dmitrieva^{1*}, T. A. Timofeeva², N. A. Oborotova^{1,2}, I. I. Krasnyuk², O. I. Stepanova²

Abstract. The main objective of pharmaceutical technology is to maximize the use of «pharmaceutical factors» for ensuring the high quality of prepared medicines, which coincides with the strategic task of biopharmacy, which is to maximize the effectiveness of medicines and reducing to the maximum of their possible adverse effect on the body. According to biopharmaceutical studies, dosage form substantially affect the validity of the included medicinal substances. In recent decades, a significant part of scientific research in the field of pharmacy is devoted to the creation of dosage forms based on targeted delivery systems of diagnostic and medicinal substances, among which liposomes have gained the greatest popularity. Liposomes are considered as promising delivery systems of drugs in the bloodstream because of its colloid properties, controlled size, surface characteristics, membranotropic and biocompatibility. However, the colloidal disperse systems are thermodynamically unstable, so the undoubted practical relevance in the development stage and the obtaining of liposomes presents a characterization and evaluation of stability of the resulting product. For this purpose, as a rule, use 3 core indicators – size of vesicles, polydispersity index and zeta-potential. The size of liposomes is one of the main indicators of the quality of liposomal preparation, which mainly depends on its component composition and technology. Dispersion of liposomes significantly affects the rate of elimination and distribution of the drug, the concentration in biological fluids and tissues, as well as determines the mechanism of cell internalization. Since in most macromolecular and nanodisperse systems molecules and particles are not the same, when describing the properties of systems, it is necessary to use the particle distribution functions according to their parameters, i.e. in the study of real systems to take into account their polydispersity, since monodisperse approximations can lead to incorrect conclusions about the properties of particles. The width of the particle size distribution is characterized by the polydispersity index. Zeta-potential is an important indicator of the surface charge of particles and a measure of electrostatic interaction (repulsion or attraction) between particles, as well as one of the main parameters affecting the stability of dispersed systems. Liposomes with high negative or positive zeta-potential repel each other and remain monodisperse and stable, and with low zeta-potential – are able to unite, aggregate and form unstable compounds. In addition, this parameter also allows you to predict the interaction of liposomes and cells.

Keywords: pharmaceutical factors, dosage form, liposomes, liposomal dispersion, stability, zeta-potential, size of the liposomes, polydispersity index.

1 – ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, г. Москва, Каширское ш., д. 24

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

1 – N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 24, Kashirskoe sh., Moscow, 115478, Russia

2 – Sechenov First State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: dmitrieva.m@onc.ru
Тел.: 8 (499) 612 81 86

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственная терапия – один из основных методов лечения злокачественных опухолей, который динамично развивается на протяжении последних десятилетий, укрепляя и расширяя свои позиции в современной онкологии. В понятие лекарственное лечение входят все виды воздействия фармакологических средств на опухоль: химиотерапия, гормонотерапия и био- или иммунотерапия. Таким образом, лекарственная терапия – это использование с лечебной целью средств, либо тормозящих пролиферацию опухолевых клеток, либо необратимо их повреждающих, то есть обладающих прямым цитостатическим действием [25].

Специалист, который занимается изготовлением лекарственных средств, должен быть профессионально подготовлен и уметь учитывать влияние всех объективных и субъективных факторов на эффективность лекарственной терапии. Поэтому основной целью фармацевтической технологии является максимальное использование «фармацевтических факторов» для обеспечения высокого качества приготовляемых лекарств, что совпадает со стратегической задачей биофармации, которая заключается в максимальном повышении эффективности лекарств и снижении до минимума возможного нежелательного их действия на организм. К «фармацевтическим факторам» относятся:

- биологические факторы (физиологический статус пациента);
- физико-химические свойства лекарственных веществ (ЛВ) (физическое состояние и химическая модификация лекарственной субстанции, полиморфизм, степень дисперсности, агрегатное состояние, растворимость и др.);
- вид лекарственной формы (ЛФ) и путь её введения;
- вспомогательные вещества, входящие в состав ЛФ;
- технологические операции (многофакторность воздействия на активные и вспомогательные вещества в процессе приготовления ЛФ) [11, 31].

Биофармацевтическое развитие понятия ЛФ в настоящее время дает в руки исследователей разнообразные и надежные инструменты для создания инновационных лекарственных препаратов с высокими биофармацевтическими характеристиками эффективности и безопасности. Появление новых продуктов неразрывно связано с развитием технологии. В частности, новый виток эволюции технологии ЛФ обусловлен разработкой систем доставки лекарств. В первую очередь это актуально для гидрофобных лекарственных препаратов (ЛП), демонстрирующих низкие показатели биодоступности [11]. Для этого

ЛВ включают в наноструктурированные системы доставки (мицеллы, липосомы и др.) [14, 29, 37, 40, 41], получают твердые дисперсии [18], соединения-включения [34, 52] и другие носители, то есть используют технологические приемы, позволяющие дезинтегрировать до молекул, тем самым повысив растворимость и абсорбцию [11].

В последние десятилетия большую популярность в качестве систем доставки ЛВ завоевали липосомы благодаря успешному применению в клинической практике липосомальных ЛП. Успех применения липосом обусловлен тем, что они обладают рядом полезных свойств, таких как биосовместимость и биодеградируемость, малая активность в отношении антигенных, пирогенных, аллергических и токсических реакций. Кроме того, липосомы эффективно связывают и высвобождают ЛВ внутрь клеток, обеспечивают его интактность до взаимодействия с клетками-мишенями, пролонгируя действие и защищая внутреннее содержимое от инактивирующих воздействий физиологических жидкостей [27, 33].

ЛИПОСОМЫ КАК КОЛЛОИДНАЯ ДИСПЕРСНАЯ СИСТЕМА

Липосомы рассматриваются как перспективные системы доставки препаратов в кровяное русло благодаря своим коллоидным свойствам, контролируемым размерам, поверхностным характеристикам, мембранотропности и биосовместимости [33].

Липосомы были открыты в середине 1960-х годов английским ученым Алеком Бэнгхемом. Выясняя роль фосфолипидов (ФЛ) в свертывании крови, он изучал структуру коллоидных дисперсий, образующихся при набухании ФЛ в избытке воды. На электронных микрофотографиях Бэнгхем увидел слоистые частицы, удивительно похожие на мембранные структуры клетки. Следующее исследование показало, что неорганические ионы, присутствующие в растворе в момент набухания ФЛ, включаются внутрь этих частиц и удерживаются там длительное время, обмениваясь с ионами наружного раствора с очень малой скоростью. Так, впервые было установлено, что ФЛ, являющиеся основными компонентами клеточных мембран, способны самопроизвольно образовывать в воде замкнутые мембранные оболочки. Эти оболочки захватывают в себя часть окружающего водного раствора, а образующая их фосфолипидная мембрана обладает свойствами полупроницаемого барьера, легко пропускающего воду, но препятствующего диффузии растворенных в ней веществ [3].

В общем плане липосомальные системы представляют собой искусственные наноразмерные коллоидные сферы, которые состоят из липидного бислоя (фосфолипиды, фосфолипид и холестерин), окружающего активный фармацевтический компонент (гид-

рофильные, гидрофобные, жирорастворимые, амфифильные ЛВ) [2]. Однако нередко в научной литературе встречаются выражения «суспензия липосом», «липосомальная эмульсия», что применительно к сложной структуре липосом не совсем верно. Так, согласно ГФ XIII, суспензия представляет собой гетерогенную дисперсионную систему, содержащую одно или несколько твердых действующих веществ, распределенных в жидкой дисперсионной среде, а эмульсия – гетерогенную двухфазную дисперсную систему с жидкой дисперсной фазой и жидкой дисперсионной средой [10]. Помимо структуры, липосомальную дисперсию от обычных, крупнодисперсных жировых эмульсий отличают меньшие размеры частиц, меньшая вязкость, огромная суммарная площадь контакта со средой, большая устойчивость (не требуется введение стабилизатора – эмульгатора) и др., от наноэмульсий – состав, а от грубых, быстро оседающих суспензий с низкой кинетической устойчивостью – условие высокодисперсности [17, 26]. Отличительные особенности структуры эмульсионной, суспензионной и липосомальной дисперсии представлены на рисунке 1.

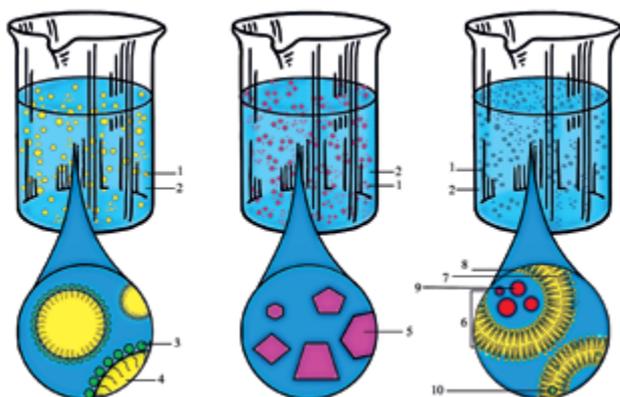


Рисунок 1. Структура дисперсных систем – эмульсии (тип «масло в воде»), суспензии и липосом. Обозначения: 1 – дисперсная фаза, 2 – дисперсионная среда, 3 – молекулы эмульгатора, 4 – капля масла, 5 – частица твердого вещества, 6 – липидный бислои, 7 – неполярный «хвост» ФЛ, 8 – полярная «головка» ФЛ, 9 – гидрофильное ЛВ, 10 – гидрофобное или жирорастворимое ЛВ

Свойства нанодисперсных систем существенно зависят от электрического заряда, дипольного момента и поляризуемости наночастиц, их размера и формы [1]. Ввиду наличия частиц со свободной поверхностной энергией коллоидные дисперсные системы, к которым относятся и липосомы, являются термодинамически неустойчивыми, потому что стремление этой энергии к уменьшению приводит к агрегации частиц [26]. Поэтому несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомальной ЛФ представляет характеристика и оценка устойчивости (стабильности) полученного продукта, причем изучению последней уделено особое внимание.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПОКАЗАТЕЛИ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИПОСОМ

Для характеристики и оценки стабильности липосомального препарата, как правило, используют 3 основных показателя – размер везикул, индекс полидисперсности и дзета(ζ)-потенциал [38, 39, 43–45].

Размеры везикул

Измерение размеров малых молекул в настоящее время представляет большой интерес во многих приложениях. Это, например, относится к белкам, используемым в фармацевтической промышленности в качестве активных составляющих ЛФ, и размер молекул в этом случае может использоваться как критерий контроля качества [36]. Также размер применяется как показатель качества при получении наночастиц, который определяет стабильность производимой продукции [36, 49]. Это обусловлено тем, что изменение дисперсности влияет на природу систем. Так, с увеличением дисперсности частичек изменяется природа системы, постепенно теряется представление об агрегатном состоянии дисперсной фазы и возникает истинный раствор [32].

Говоря о размерах наночастиц, в частности липосом, нельзя не отметить их естественное стремление к формированию более крупных структур (конъюгаты, агрегаты и т.п.). К этому многих из них принуждают силы поверхностной активности, не уравновешенные внутренним состоянием атомарно-молекулярного взаимодействия [2].

В зависимости от размера везикул и числа образующих липидных слоев (ламелл) выделяют следующие классы липосом.

- ✓ Мультиламеллярные везикулы, которые состоят из нескольких десятков, а то и сотен липидных бислоев, разделенных водными промежутками, и имеют довольно крупные размеры – от 500 нм до 50 мкм. Данный вид липосом может применяться для транспортировки в опухоль двух и более компонентов, а также для транспортировки макромолекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты.
- ✓ Олиголамеллярные везикулы, которые в отличие от мультиламеллярных состоят из 2–4 бислоев с диаметром от 100 до 1000 нм.
- ✓ Моноламеллярные везикулы, которые образованы одним липидным бислоем и подразделяются на малые (20–100 нм) и большие (100–1000 нм). Моноламеллярные везикулы обычно используют для доставки одного ЛВ [3, 21, 24, 35, 48].

Размер частиц зависит от двух основных групп факторов:

1. Компонентного состава – концентрации и свойств активного и вспомогательных веществ [22, 49].

Например, с увеличением концентрации ЛВ наблюдается образование более крупных везикул. Исследования по получению липосом дексаметазона различного липидного состава, проводимые Н. Л. Лепарской и др. [20], показали, что увеличение исходной концентрации изучаемого глюкокортикоида приводит к сильному укрупнению агрегатов и образованию микрочастиц размером 2317 ± 45 нм по сравнению с исходными 202 ± 5 нм. Также на размер липидных частиц влияет концентрация и соотношение твердых и жидких липидов. Замечено, что увеличение общей концентрации липидов, а также доли твердых липидов в композиции относительно жидких способствует пропорциональному росту частиц в размере [49].

2. Технология получения [39].

В настоящее время предложено много разнообразных способов приготовления липосом, которые дают возможность получать везикулы разного размера, состава, структуры и внутреннего объема [47]. В исследовании [19] было показано, что липосомы, полученные разными методами, гетерогенны по величине везикулы. Наиболее крупные липосомы получены с помощью метода ручного встряхивания (250–1900 нм). Липосомы, полученные методами этанольной инъекции и выпаривания в обращенной фазе, в среднем были приблизительно в 2 раза мельче – 100–800 и 150–950 нм соответственно. Обработанные ультразвуком липосомы оказались более однородными по размеру и очень мелкими (средний диаметр 12 нм). Также в ряде исследований была продемонстрирована зависимость размера липосом на этапе лиофилизации от таких технологических факторов, как тип криопротектора, его концентрация и этап введения в липосомальную дисперсию, а также режим сублимации [15, 28, 42, 53].

Дисперсность или размер частиц в значительной степени влияет на скорость элиминации и характер распределения ЛВ, концентрацию в биологических жидкостях и тканях. Так, установлено, что частицы диаметром более 200 нм могут активировать систему комплемента в организме человека и удаляться из кровотока купферовскими клетками. Кроме того, во время фильтрации в селезенке захватываются частицы, размер которых превышает 200–250 нм, а во время печеночной фильтрации задерживаются частицы диаметром более 150 нм. Таким образом, липосомы меньшего диаметра имеют преимущества перед липосомами больших размеров, поскольку они могут избегать фагоцитоза клетками ретикулоэндотелиальной системы и способны легко проникать в межклеточное пространство. Однако частицы размером менее 100 нм име-

ют высокую тенденцию к образованию кластеров и агрегатов, которые также могут приводить к эмболизации и далее вызывать инсульты, инфаркты миокарда и других органов. В литературе подробно обсуждаются механизмы селективного накопления наноструктурированных ЛВ в патологических очагах (опухолях, воспаленных тканях), при этом уровень и селективность накопления липосом в опухоли зависит от диаметра везикулы и его соотношения с размерами дефектов сосудов. В зависимости от типа опухоли эти дефекты имеют размеры от сотен нанометров до нескольких микрон. В связи с вышеизложенным в настоящее время исследования в области нанофармации сосредоточены на частицах размером менее 200 нм [4, 12].

Размер частиц является решающим фактором и в трансдермальной доставке лекарств, поскольку им необходимо преодолеть роговой слой [49]. Для прохождения через эпидермис любой частице или веществу необходимо преодолеть узкие межклеточные промежутки. Показано, что крупные молекулы (белки, полисахариды) не в состоянии этого сделать. Кроме того, липиды, заполняющие эти промежутки, представляют собой гидрофобную среду, не пропускающую водорастворимые соединения. Насыщенные жиры впитываются плохо, так как, смешиваясь с эпидермальными липидами, они делают их более жесткими и менее проницаемыми. Поэтому препараты на их основе оказывают на кожный покров только поверхностное воздействие. Вместе с тем через липидный барьер легко просачиваются небольшие жирорастворимые молекулы – компоненты масел и жиров, разжижая липидные пласты и повышая их проницаемость [23]. Таким образом, липосомальные системы являются оптимальными носителями для транспортировки как лекарственных, так и биологически активных веществ внутрь кожного покрова.

Размер частиц является важным параметром, который определяет механизм интернализации клеток. Показано, что частицы диаметром менее 200 нм вводятся в клетки с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза, а частицы размером 200–500 нм поступают через кавеоло-опосредованный эндоцитоз [46].

Необходимость метрологической характеристики наночастиц вызвала потребность в соответствующем инструментарии, который обеспечивал бы должную точность и сопоставимость результатов измерений. Однако существует очень мало доступных (рутинных) методов измерения размеров малых молекул и частиц в растворах [36].

Размеры частиц дисперсных систем соизмеримы с длиной световых волн, поэтому, кроме общих для всех растворов явлений преломления и поглощения света в различных областях спектра, коллоидные растворы обладают также рядом своеобразных оптических свойств. Благодаря тесной связи оптических свойств

с внутренним строением и формой коллоидных частиц и точности оптических методов измерений они в настоящее время относятся к числу основных методов исследования коллоидных систем, в частности, при определении размеров дисперсных частиц и макромолекул [26]. Частички тонкодисперсной системы можно обнаружить в ультра- или электронном микроскопе [32].

Для измерения размеров липосом (а также ζ -потенциала) чаще всего используют методы общего динамического светорассеяния (Dynamic light scattering, DLS), которые заключаются в анализе движения частиц, вызванного тепловым шумом или электрофоретической силой. Диэлектрическая спектроскопия частиц с помощью общей микроскопической электроротации (electrorotation, ER) измеряет частотную зависимость индуцированного полем вращения отдельных частиц для анализа присущей им диэлектрической структуры. Электророторное рассеяние света (electrorotational light scattering, ERLS) измеряет ER в ансамбле частиц с помощью гомодинной DLS-установки. Вращение ER-индуцированных частиц из исходной декорреляции автокорреляционной функции интенсивности осуществляется с помощью простой модели оптических частиц. Хотя абсолютная скорость вращения и направление вращения еще не доступны, ERLS устраняет утомительные микроскопические измерения. Он предлагает компьютеризированные статистически значимые измерения свойств диэлектрических частиц, которые особенно подходят для небиологических применений, например для изучения коллоидных частиц [44]. Размер, получаемый при измерении методом DLS, – это гидродинамический диаметр сферы, которая имеет такой же средний коэффициент диффузии, как и исследуемая молекула. Метод DLS является быстрым, дешевым, хорошо воспроизводимым. Нижний размерный предел метода динамического светорассеяния определяется интенсивностью избыточного рассеяния. Избыточное рассеяние есть разница между рассеянием от исследуемой молекулы или частицы и дисперсанта, в котором она находится. Эта разница, в свою очередь, зависит от нескольких факторов, таких как показатели преломления молекулы и дисперсанта, концентрация образца, мощность и длина волны используемого лазера, чувствительность детектора и оптическая конфигурация анализатора. Помехи могут генерироваться присутствующими в образце примесями, такими как единичные частицы пыли микрометрового размера, что приводит к искажению показателя светорассеяния от малых частиц. Кроме того, значительные трудности возникают при интерпретации данных для гетерогенных образцов (с большим разбросом частиц по размерам) [9, 36].

Применительно к наночастицам рассматриваемый метод существенно усовершенствован за счет использования трансмиссионных решеток. Данная модификация широко применяется для установления

распределения по размерам в диапазоне 10–100 нм различных типов наночастиц. При помощи метода DLS возможно измерение частиц субнанометровых размеров при условии тщательной подготовки образцов и использования соответствующей оптической конфигурации анализатора. Использование детектирования обратнорассеянного света в сочетании с волоконной оптикой обеспечивает исключительную чувствительность анализатора и достаточно высокое отношение сигнал/шум, что позволяет достоверно измерять образцы с такими исключительно малыми размерами частиц [9, 36].

Прямым методом определения размеров и формы наночастиц является метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Размеры липосом, полученные с помощью электронной микроскопии, коррелируют с размерами липосом, полученными с помощью метода DLS. Размеры липосом, определенные методом DLS, несколько больше (5–7%) размеров липосом, определенных методом ПЭМ. Такое расхождение является типичным и объясняется тем, что при использовании DLS измеряется гидродинамический радиус частицы, который всегда больше реального. Однако следует учитывать сложную, длительную, дорогую и труднопроизводимую пробоподготовку образцов [6].

Индекс полидисперсности

Ширину распределения частиц по размерам характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersity index, PDI). В большинстве макромолекулярных и нанодисперсных систем молекулы и частицы неодинаковы, и при описании свойств систем необходимо использовать функции распределения частиц по их параметрам, то есть при исследовании реальных систем учитывать их полидисперсность, так как монодисперсные приближения могут приводить к неверным заключениям о свойствах частиц [1]. Значения PDI ранжируются от 0 до 1. Чем ближе значение PDI к 0, тем частицы более гомогенны. Так же как и размер частиц, значение PDI зависит от состава продукта, например увеличение количества ЛВ и твердых липидов в композиции приводит к увеличению уровня PDI [49]. Кроме того, значение PDI является очень чувствительным к присутствию агрегатов или загрязнений (пыли, инородных объектов). Ожидаемые значения PDI для монодисперсных образцов не должны превышать 0,05 [36].

Дзета-потенциал

ζ -потенциал является важным индикатором поверхностного заряда частиц и мерой электростатического взаимодействия (отталкивания или притяжения) между частицами, а также одним из основных параметров, влияющих на стабильность дисперсных систем. Согласно физической теории устойчивости

коллоидных систем ДЛФО (теория Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека) стабильность коллоидных систем определяется двойным электрическим слоем и образованием вандерваальсовых сил, которые обуславливают приближение частиц друг к другу. Энергетический барьер, представленный силами отталкивания, должен быть достаточно большим, чтобы предотвратить контакт частиц друг с другом, их адгезию и образование агрегатов. Если этот энергетический барьер будет преодолен за счет сил Ван-дер-Ваальса, частицы будут взаимодействовать друг с другом, слипаться, что является нежелательным для липосомальных систем доставки различных ЛВ [7, 13]. Однако следует отметить, что теория ДЛФО применима в отношении взаимодействия фосфолипидных бислоев в случаях, когда толщина водной прослойки превышает 3 нм. На меньших расстояниях наблюдается сильное отклонение от предсказаний теории ДЛФО, что обусловлено существованием специфических сил между поверхностями в водном электролите на малых расстояниях (структурные силы), отличающихся от электростатических и вандерваальсовых сил [8].

Скорость внедрения новых рецептур является ключом к успеху. При приготовлении липосомальных форм важной задачей является получение стабильной монодисперсной системы, которая сохраняет монодисперсность и размер частиц. В зависимости от знака заряда различают традиционные (отрицательно заряженные) и катионные (положительно заряженные) липосомы, что обусловлено различием липидного состава или включением в рецептуру иных вспомогательных компонентов. Классические, или традиционные, липосомы, полученные на основе природных и синтетических ФЛ (фосфотидилхолин, кардиолипин, фосфотидилэтаноламин и др.), имеют нейтральный или отрицательный заряд. Для получения катионных липосом, применяемых, как правило, с целью доставки генетического материала, используют положительно заряженные липиды и катионные полимеры (сфингазины, ганглиозиды, октадесеноамиды, полиамины, полипептиды и др.). Классические же липосомы не могут непосредственно взаимодействовать с отрицательно заряженной молекулой ДНК. Однако они образуют мембранные пузырьки (везикулы) с большим внутренним объемом, способным заключать значительное количество генетического материала, и обладают некоторой трансфекционной активностью [7, 16, 43, 50].

Измерение ζ -потенциала липосомальной дисперсии представляет интерес по двум причинам. Во-первых, величина ζ -потенциала липосом определяет их стабильность [7]. Измерение ζ -потенциала позволяет глубже понять и лучше контролировать механизмы диспергирования, агрегации или флокуляции и может применяться для улучшения свойств различных дис-

персий, в том числе липосомальных, коллоидных растворов, эмульсий и суспензий на этапах разработки и производства [13, 51]. Липосомы с высоким отрицательным или положительным ζ -потенциалом отталкиваются друг от друга и остаются монодисперсными и стабильными. Липосомы с низким ζ -потенциалом способны объединяться, агрегировать и образовывать нестабильные составы [7].

Во-вторых, этот параметр также позволяет предсказать взаимодействие липосом и клеток [7]. Известно, что поверхность клеточной мембраны благодаря присутствию кислых ФЛ отрицательно заряжена, поэтому липосомы, несущие положительный заряд, лучше включаются в клетки, в то время как использование для трансфекции ЛВ посредством липосом из нейтральных и отрицательно заряженных ФЛ не увенчалось значительным успехом, прежде всего вследствие их слабого взаимодействия с поверхностью клеток, что является необходимым условием для транспорта содержимого липосом в цитоплазме [5, 30].

Кроме того, измерение ζ -потенциала – это одна из возможностей сокращения периода проверки стабильности за счет уменьшения количества разработок и, таким образом, сокращения длительности и затрат на тестирование и увеличения срока хранения.

Существенным образом на значение ζ -потенциала при характеристике липосомальной системы влияет пробоподготовка. Дело в том, что на изоэлектрическое состояние коллоидной системы влияет концентрация образующих ее веществ. При разбавлении коллоидного раствора до определенного предела происходит увеличение ζ -потенциала, так как толщина двойного электрического слоя возрастает в результате уменьшения концентрации противоионов в диффузионном слое. При сильном разбавлении такого раствора происходит десорбция потенциалопределяющих ионов, что приводит к уменьшению ζ -потенциалов. Может случиться, что электрокинетический потенциал будет равен нулю и система примет изоэлектрическое состояние. При повышении концентрации наблюдается сжатие двойного электрического слоя липосомы [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биофармацевтическое развитие понятия ЛФ в настоящее время дает в руки исследователей разнообразные и надежные инструменты для создания инновационных лекарственных препаратов с высокими биофармацевтическими характеристиками эффективности и безопасности. В последние десятилетия большую популярность в качестве систем доставки ЛВ завоевали липосомы благодаря успешному применению в клинической практике липосомальных ЛП. В общем плане липосомальные системы представля-

ют собой искусственные наноразмерные коллоидные сферы, свойства которых существенно зависят от ряда физико-химических факторов. Ввиду наличия частиц со свободной поверхностной энергией коллоидные дисперсные системы являются термодинамически неустойчивыми. Поэтому несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомальной ЛФ представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по 3 основным показателям – размеру везикул, индексу полидисперсности и ζ -потенциалу.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДЛФО	теория Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека.
ЛВ	лекарственное вещество.
ЛП	лекарственный препарат.
ЛФ	лекарственная форма.
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия.
ФЛ	фосфолипид.
DLS	dynamic light scattering.
ER	electrorotation.
ERLS	electrorotational light scattering.
PDI	polydispersity index.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаджаниянц Л. К., Войтылов А. В., Войтылов В. В., Трусов А. А.* Анализ полидисперсности макромолекулярных и нанодисперсных систем электрооптическими методами // Высокомолекулярные соединения. Серия С. 2010. Т. 52. № 5. С. 1–12. [Babadjanyanc L. K., Voitilov A. V., Voitilov V. V., Trusov A. A. Analiz polidispersnosti makromolekulyarnih i nanodispersnih sistem elektroopticheskimi metodami // Visokomolekulyarnie soedineniya. Seriya S. [Analysis of the polydispersity of macromolecular and nanodisperse systems by electro-optic methods // High-Molecular Compounds. Series C.] 2010. T. 52. № 5. P. 1–12.]
2. *Баллюзек Ф. В., Куркаев А. С., Сенте Л.* Нанотехнологии для медицины. Санкт-Петербург, «Сезам-Принт», 2008. 104 с. [Ballyuzek F. V., Kurkaev A. S., Sente L. Nanotehnologii dlya medicini. [Nanotechnology for medicine.] St.-Peterburg, «Sezam-Print», 2008. 104 c.]
3. *Барсуков Л. И.* Липосомы // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 10. С. 2–9. [Barsukov L. I. Liposomi // Sorosovskii obrazovatel'nyi jurnal. [Liposomes // Soros Educational Journal.] 1998. № 10. P. 2–9.]
4. *Барышников А. Ю.* Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. 2012. № 3. С. 23–30. [Barishnikov A. Yu. Nanostrukturirovannye liposomalnye sistemi kak sredstvo dostavki protivopuholevix preparatov. [Nanostructured liposomal systems as a means of antitumor drugs delivery.] // Vestnik RAMN. 2012. № 3. P. 23–30.]
5. *Геннис Р.* Биомембраны: молекулярная структура и функции / Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. 624 с. [Gennis R. Biomembrani: molekulyarnaya struktura i funkcii [Biomembranes: molecular structure and functions.] / Per. s angl. – M.: Mir, 1997. 624 p.]
6. *Борщевский Г. И., Янчук И. Б., Ярных Т. Г.* Изучение физико-химических свойств липосомальных препаратов // Украинский биофармацевтический журнал. 2015. № 6(41). С. 4–8. [Borshevskii G. I., Yanchuk I. B., Yarnih T. G. Izuchenie fiziko-himicheskikh svoystv liposomalnih preparatov // Ukrainskii biofarmaceuticheskii jurnal. [A study of the physico-chemical properties of liposomal preparations // Ukrainian Biopharmaceutical Journal.] 2015. № 6(41). P. 4–8.]
7. *Брусслер Я., Нифонтова Г. О., Баковски У., Штейнмецер Т.* Липосомальная форма новых синтетических ингибиторов тромбина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 36–46. [Brussler Ya., Nifontova G. O., Bakovski U., Shteinmecer T. Liposomalnaya forma novih sinteticheskikh inhibitorov trombina // Razrabotka i registraciya lekarstvennih sredstv. [Liposomal form of new synthetic thrombin inhibitors // Drug Development & Registration.] 2013. № 3(4). P. 36–46.]
8. *Вода в дисперсных системах / Б. В. Дерягин, Н. В. Чураев, Ф. Д. Овчаренко.* Москва, Химия, 1989. 288 с. [Voda v dispersnih sistemah. [Water in disperse systems.] / B. V. Deryagin, N. V. Churaev, F. D. Ovcharenko. M., Himiya. 1989. 288 p.]
9. *Гмошинский И. В., Хотимченко С. А., Попов В. О. и др.* Наноматериалы и нанотехнологии: методы анализа и контроля // Успехи химии. 2013. Т. 82. № 1. С. 48–76. [Gmoshinskii I. V., Hotimchenko S. A., Popov V. O. et al. Nanomaterialy i nanotehnologii: metodi analiza i kontrolya // Uspehi himii. [Nanomaterials and nanotechnologies: methods of analysis and control // Advances in Chemistry.] 2013. T. 82. № 1. P. 48–76.]
10. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2 / МЗ РФ. Москва, 2015. 1004 с. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federacii. XIII izd. T. 2. / MZ RF. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed. T. 2 / Ministry of Health of the Russian Federation.] M. 2015. 1004 p.]
11. *Демина Н. Б.* Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 8–13. [Demina N. B. Biofarmaciya – put k sozdaniyu innovacionnih lekarstvennih sredstv // Razrabotka i registraciya lekarstvennih sredstv. [Biopharmacy is the way to create innovative drugs // Drug Development & Registration.] 2013. № 1(2). P. 8–13.]
12. *Демина Н. Б., Скатков С. А.* Стратегии развития и биофармацевтические аспекты систем доставки лекарств // Рос. Хим. Ж. (Ж. Рос. Хим. Об-ва им. Д.И. Менделеева). 2012. Т. LVI. № 3(4). С. 5–10. [Demina N. B., Skatkov S. A. Strategii razvitiya i biofarmaceuticheskie aspekti sistem dostavki lekarstv // Ros. Him. J. [Development Strategies and Biopharmaceutical Aspects of Drug Delivery Systems // Russian Chemical Journal.] (J. Ros. Him. Ob-va im. D.I. Mendeleeva). 2012. T. LVI. № 3(4). P. 5–10.]
13. Дзета-потенциал. 2017. [Dzeta-potencial. 2017.] Available at: <http://www.malvern.com/ru/products/measurement-type/zeta-potential> (accessed 10.12.17).
14. *Дмитриева М. В., Оборотова Н. А., Орлова О. Л. и др.* Липосомальная лекарственная форма борхлорина // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. № 1. С. 31–36. [Dmitrieva M. V., Oborotova N. A., Orlova O. L. et al. Liposomalnaya lekarstvennaya forma borhlorina // Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal. [Liposomal dosage form of borchlorin // Russian Biotherapeutic Journal.] 2014. T. 13. № 1. P. 31–36.]
15. *Дмитриева М. В., Полозкова А. П., Орлова О. Л. и др.* Разработка технологии лиофилизации липосомального борх-

- лорина // Биофармацевтический журнал. 2017. Т. 9. № 1. С. 32–37. [Dmitrieva M. V., Polozkova A. P., Orlova O. L. et al. Razrabotka tehnologii liofilizatsii liposomalnogo borhlorina // Biopharmaceuticheskiy jurnal. [Development of the technology of lyophilization of liposomal borchlorin // Biopharmaceutical Journal.] 2017. T. 9. № 1. P. 32–37.]
16. Кисякова М. А., Гаврилюк А. Ф., Воронкова О. С. и др. Липосомы: структура, свойства, способы введения в организм с терапевтическими целями // Вестник Днепропетровского университета. Биология, экология. 2010. № 1. С. 52–57. [Kisyakova M. A., Gavrilyuk A. F., Voronkova O. S. et al. Liposomi: struktura, svoistva, sposobi vvedeniya v organizm s terapevticheskimi celyami // Vestnik Dnepropetrovskogo universiteta. Biologiya, ekologiya. [Liposomes: structure, properties, ways of introduction into an organism with therapeutic purposes // Bulletin of Dnepropetrovsk University. Biology, ecology.] 2010. № 1. P. 52–57.]
 17. Королева М. Ю., Юртов Е. В. Наноэмульсии: свойства, методы получения и перспективные области применения // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 1. С. 21–43. [Koroleva M. Yu., Yurtov E. V. Nanoemulsii: svoistva, metodi polucheniya i perspektivnie oblasti primeneniya // Uspehi himii. [Nanoemulsions: properties, methods of production and promising fields of application // Advances in Chemistry.] 2012. T. 81. № 1. P. 21–43.]
 18. Краснюк И. И. (мл.), Овсянникова Л. В., Степанова О. И. и др. Применение твердых дисперсий с нестероидными противовоспалительными средствами в фармации // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 40–44. [Krasnyuk I. I. (ml.), Ovsyannikova L. V. Stepanova O. I. et al. Primenenie tverdykh dispersii s nesteroidnimi protivovospalitel'nimi sredstvami v farmacii // Razrabotka i registraciya lekarstvennih sredstv. [The use of solid dispersions with non-steroidal anti-inflammatory agents in pharmacy // Drug Development & Registration.] 2016. № 2 (15). P. 40–44.]
 19. Кузякова Л. В. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестник Московского Университета, сер. 2. Химия. 2005. Т. 46. № 1. С. 74–79. [Kuzyakova L.V. Konstruirovaniye transdermalnih liposomalnih preparatov s zadannimi svoystvami // Vestnik Moskovskogo Universiteta, ser. 2. Himiya. [Construction of transdermal liposomal preparations with given properties // Bulletin of Moscow University, ser. 2. Chemistry.] 2005. T. 46. № 1. P. 74–79.]
 20. Лепарская Н. Л., Сорокоумова Г. М., Сычева Ю. В. и др. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6. № 2. С. 37–42. [Leparskaya N. L., Sorokoumova G. M., Sicheva Yu. V. et al. Liposomi, sodержaschie deksametazon: poluchenie, harakteristika i ispolzovanie v oftalmologii // Vestnik MITHT. 2011. T. 6. № 2. С. 37–42. [Leparskaya N. L., Sorokoumova G. M., Sicheva Yu. V. et al. Liposomes containing dexamethasone: production, characterization and use in ophthalmology.] // Vestnik MITHT. 2011. T. 6. № 2. P. 37–42.]
 21. Лиманская Л. А., Юдинцев А. В., Куценко О. К. и др. Мультифункциональные липосомальные наносистемы для доставки новых противоопухолевых лекарственных препаратов на основе хелатов европия // Наносистемы, Наноматериалы, Нанотехнологии. 2010. Т. 8. № 4. С. 764–774. [Limanskaya L. A., Yudinцев A. V., Kucenko O. K. et al. Multifunkcionalnie liposomalnie nanosistemi dlya dostavki novih protivopuholevikh lekarstvennih preparatov na osnove helatov evropiya // Nanosistemi, Nanomateriali, Nanotehnologii. [Multifunctional liposomal nanosystems for delivery of new antitumor drugs based on europium chelates // Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies.] 2010. T. 8. № 4. P. 764–774.]
 22. Малиновская Ю. А., Демина Н. Б. Разработка липосомальных форм симвастина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 5. С. 46–53. [Malinovskaya Yu. A., Demina N. B. Razrabotka liposomalnih form simvastatina // Razrabotka i registraciya lekarstvennih sredstv. [Liposomal forms of simvastatin development // Drug Development & Registration.] 2013. № 5. P. 46–53.]
 23. Марголина А. А., Эрнандес Е. И., Зайкина О. Э. Новая косметология. Москва, 2000. 204 с. [Margolina A. A., Ernandes E. I., Zaikina O. E. Novaya kosmetologiya. [New Cosmetology.] M, 2000. 204 p.]
 24. Михайлова Т. В., Барышникова М. А., Клименко О. В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. 2011. № 4. С. 61–65. [Mihailova T. V., Barishnikova M. A., Klimenko O. V. et al. Razrabotka liposomalnoi formi protivopuholevoi vakcini // Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal. [A liposomal form of an antitumor vaccine development // Russian Biotherapeutic Journal.] 2011. № 4. P. 61–65.]
 25. Онкология для практикующих врачей: учеб. пособие / под ред. С. С. Чистякова. Москва, Авторская академия, Товарищество научных изданий КМК, 2009. 632 с. [Onkologiya dlya praktikuuyuschih vrachei: ucheb. posobie / pod red. S. S. Chistyakova. [Oncology for practicing doctors: Textbook / ed. S. S. Chistyakov.] M., Avtorskaya akademiya, Tovarischestvo nauchnih izdaniy KMK, 2009. 632 p.]
 26. Пасынский А. Г. Коллоидная химия / под ред. акад. В. А. Каргина. 3-е изд. Москва, изд. «Высшая школа», 1968, 232 с. [Pasinskii A. G. Kolloidnaya himiya / pod red. akad. V.A. Kargina. 3 izd. [Colloid chemistry / ed. by acad. V. A. Kargina. 3rd ed.] M., izd. «Visshaya shkola», 1968, 232 p.]
 27. Райков А. О., Хашем А., Барышникова М. А. Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 2. С. 90–96. [Raikov A. O., Hashem A., Barishnikova M. A. Liposomi dlya napravlennoi dostavki protivopuholevikh preparatov // Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal. [Liposomes for the targeted delivery of antitumor drugs // Russian Biotherapeutic Journal.] 2016. T. 15. № 2. P. 90–96.]
 28. Санарова Е. В., Игнатьева Е. В., Ползкова А. П., Оборотова Н. А. Оценка влияния криопротекторов на размер липосом Тиосенса // Материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (22–23 марта 2011 г., Москва) // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т. 10. № 1. С. 54. [Sanarova E. V., Ignateva E. V., Polzkova A. P., Oborotova N. A. Ocenka vliyaniya krioprotectorov na razmer liposom Tiosensa // Materiali X Vserossiiskoi nauchnoi konferencii s mejdunarodnim uchastiem «Otechestvennie protivopuholevie preparati», 22–23 marta 2011, Moskva // Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal. [Evaluation of the effect of cryoprotectants on the size of Tiossens liposomes. Proceedings of the 10th All-Russian Scientific Conference with International Participation «Domestic Antitumor Preparations» (22–23 March 2011, Moscow) // Russian Biotherapeutic Journal.] 2011. T. 10. № 1. P. 54.]
 29. Смирнова З. С., Санарова Е. В., Борисова Л. М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т. 10. № 4. С. 55–59. [Smirnova Z. S., Sanarova E. V., Borisova L. M. et al. Protivopuholevaya aktivnost' fotodinamicheskoy terapii s liposomalnoy lekarstvennoy formoy tiosensa na perevivayemykh opukolyah myshей // Rossiiskii bioterapevticheskii jurnal. 2011. T. 10. № 4. С. 55–59.]

- Borisova L. M. et al. Protivoopuholevaya aktivnost fotodinamicheskoi terapii s liposomalnoi lekarstvennoi formoi tiosensa na perevivaemih opuholyah mishei // Rossiiskii bioterapevcheskii jurnal. [Antitumor activity of photodynamic therapy with liposomal drug form of thiosens on transplanted tumors of mice // Russian Biotherapeutic Journal.] 2011. T. 10. № 4. P. 55–59.]
30. Тараховский Ю. С., Иваницкий Г. Р. Липосомы в генной терапии. Структурный полиморфизм липидов и эффективность доставки генетической информации // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 6. С. 723–736. [Tarahovskii Yu. S., Ivanickii G. R. Liposomi v gennoi terapii. Strukturnii polimorfizm lipidov i effektivnost dostavki genicheskoi informacii // Biohimiya. [Liposomes in gene therapy. Structural polymorphism of lipids and the efficiency of delivery of genetic information // Biochemistry.] 1998. T. 63. V. 6. P. 723–736.]
 31. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств. Т. 1 / Под ред. И. М. Перцева, И. А. Зупанца. Харьков, издательство УкрФА, 1999. 461 с. [Farmaceuticheskie i mediko-biologicheskie aspekti lekarstv. T. 1 / Pod red. I. M. Perceva, I. A. Zupanca. [Pharmaceutical and biomedical aspects of medicines. V. 1 / Ed. by I. M. Pertseva, I. A. Zupanets.] Harkov, izdatelstvo UkrFA, 1999. 461 p.]
 32. Физическая и коллоидная химия / А. И. Кононский. Киев, Высшая школа, 1986. 312 с. [Fizicheskaya i kolloidnaya himiya [Physical and colloid chemistry.] / A. I. Kononskii. Kiev, Visshaya shkola, 1986. 312 p.]
 33. Шанская А. И., Пучкова С. М., Яковлева Т. Е. Липосомы – перспективная форма лекарственных препаратов // Медицина экстремальных ситуаций. 2011. № (37). С. 100–104. [Shanskaya A. I., Puchkova S. M., Yakovleva T. E. Liposomi – perspektivnaya forma lekarstvennih preparatov // Medicina ekstremalnih situacii. [Liposomes is a promising form of drugs // Medicine of extreme situations.] 2011. № 3(37). P. 100–104.]
 34. Brewster M. E. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers // Advanced Drug Delivery reviews. 2007. V. 59. P. 645–666.
 35. Falcao C. B. Multifunctional liposomes for enhanced anticancer therapy // Pharmaceutical Science Dissertations. 2011. P. 1–98.
 36. Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T. et al. Measuring sub nanometre sizes dynamic light scattering // J Nanopart Res. 2008. V. 10. P. 823–829.
 37. Lee K. S., Chung H. C., Im S. A. et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer // Breast Cancer Res Treat. 2008. V. 108(2). P. 241–250.
 38. Mahmud M., Piwoni A., Filiczak N. et al. Long-circulating curcumin-loaded liposome formulations with high incorporation efficiency, stability and anticancer activity towards pancreatic adenocarcinoma cell lines *in vitro* // PLoS ONE. 2016. V. 11(12): e0167787.
 39. Matuszak J., Baumgartner J., Zaloga J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing // Nanomedicine. 2016. V. 11(6). P. 597–616.
 40. Oborotova N., Treshalina E., Bashakova Z. et al. Possible application of the new lipidocytostatic D-152 in different drug formulation // Pharmaceutski vestnic, Ljubljana. 1997. V. 48. P. 278–279.
 41. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release // Pharm Res. 2010. V. 27. P. 2569–2589.
 42. Ohtake Satoshi, Schebor C., de Pablo J.J. Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC–cholesterol unilamellar vesicles // Biochimica et Biophysica Acta. 2006. V. 1758. P. 65–73.
 43. Oskuee R. K., Mahmoudi A., Gholami L. et al. Cationic liposomes modified with polyallylamine as a gene carrier: preparation, characterization and transfection efficiency evaluation // Adv Pharm Bull. 2016. V. 6(4). P. 515–520.
 44. Prüger B., Eppmann P., Donath E., Gimsa J. Measurement of Inherent Particle Properties by Dynamic Light Scattering: Introducing Electrorotational Light Scattering // Biophysical Journal. 1997. V. 72(3). P. 1414–1424.
 45. Reiner Zeisig, Kazuhiko Shimada, Sa-dao Hirota, Dieter Arndt. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake *in vitro* and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines // Biochimica et Biophysica Acta. 1996. V. 1285. P. 237–245.
 46. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis // Biochem J. 2004. V. 377(Pt. 1). P. 159–69.
 47. Riaz M. Liposomes preparation methods // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 1996. V. 19(1). P. 65–77.
 48. Serda R. E., Godin B., Blanco E. et al. Multistage delivery nano-particle systems for therapeutic applications // Biochim Biophys Acta. 2011. V. 1810(3). P. 317–329.
 49. Suhaimi S. H., Hasham R., Rosli N. A. Effects of formulation parameters on particle size and polydispersity index of orthosiphon stamineus loaded nanostructured lipid carrier // Journal of advanced research in applied sciences and engineering technology. 2015. V. 1(1). P. 36–39.
 50. Takeuchi Ken-ichiro, Ishihara Minoru, Kawaura Chiyo et al. Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatives on gene transfection // FEBS Letters. 1996. V. 397. P. 207–209.
 51. Tohler V., Smay J. E., Braem A. et al. Nanoparticle halos: A new colloid stabilization mechanism // PNAS. 2001. V. 98(16). P. 8950–54.
 52. Vyas A., Saraf S., Saraf S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems // J Incl Phenom Macrocycl Chem. 2008. V. 62. P. 23–42.
 53. Shuibing Y., Chengmei L., Wei L. et al. Preparation and characterization of nanoliposomes entrapping medium-chain fatty acids and vitamin C by lyophilization // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 19763–73.

25-я Международная специализированная выставка

аптека

2018

ufi
Approved
Event



РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ



DECEMBER
3-6
ДЕКАБРЯ

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ДЕЛОВОЙ
МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ**

INTERNATIONAL MEDICAL AND PHARMACEUTICAL BUSINESS FORUM

Москва
ЦВК «Экспоцентр»
павильон № 7

Рав.7, Expocentre
Fairgrounds, Moscow

*Ждем вас
на нашей
выставке!*

Организатор:

ЕВРОЭКСПО



EUROEXPO

16+

РЕКЛАМА

www.aptekaexpo.ru

УДК 615.453

БИОДОСТУПНОСТЬ КУРКУМИНА И МЕТОДЫ ЕЕ ПОВЫШЕНИЯ (ОБЗОР)

Н. Л. Соловьёва¹, М. С. Сокуренок^{1,2*}, О. А. Зырянов¹

Резюме. Куркумин – гидрофобное полифенольное соединение природного происхождения. Куркумин обладает широким спектром фармакологического действия. По своей природе полифенол плохо всасывается при пероральном приеме и обладает низкой биодоступностью, частично за счет низкой скорости всасывания в кишечнике и частично за счет быстрого метаболизма (глюкуронирования), что ограничивает его клиническое использование. Одной из важных задач является разработка эффективных форм куркумина с целью повышения биодоступности этого соединения. Это достигается за счет включения куркумина в такие системы, как липосомы, наночастицы, мицеллы и др., образования комплексов с циклодекстринами, а также использования биоэнхансеров. В частности, применение комплекса куркумина с пиперином, известным ингибитором процесса глюкуронизации в печени и кишечнике, увеличивало биодоступность куркумина в несколько раз. Сочетание куркумина с фосфолипидами за счет встраивания его в липофильные мембраны увеличивало его максимальную концентрацию по сравнению с отдельно взятым куркумином. Куркумин в виде наночастиц оказывал фармакологический эффект в более низкой – в 15 раз – концентрации, чем обычный куркумин.

Ключевые слова: куркумин, биодоступность, биоэнхансеры, пиперин, липосомы, наночастицы, циклодекстрины.

BIOAVAILABILITY OF CURCUMIN AND METHODS OF ITS ENHANCING

N. L. Soloveva¹, M. S. Sokurenkova^{1,2*}, O. A. Zyryanov¹

Abstract. Curcumin is a hydrophobic polyphenolic compound of natural origin. Curcumin has a wide range of pharmacological effects. Curcumin is inherently poorly absorbed when ingested and has low bioavailability, in part due to a low rate of absorption in the intestine and, in part, due to rapid metabolism (glucuronidation), which limits its clinical use. One of the important tasks is the development of effective forms of curcumin with the aim of increasing the bioavailability of this compound. This is achieved by including curcumin in such systems as liposomes, nanoparticles, micelles, etc., formation of complexes with cyclodextrins, and the use of bio-enhancers. In particular, the use of a complex of curcumin with piperine, a known inhibitor of the glucuronization process in the liver and intestine, increased the bioavailability of curcumin several times. Combination of curcumin with phospholipids due to its incorporation into lipophilic membranes, increased its maximum concentration in comparison with an individual curcumin. Curcumin in the form of nanoparticles had a pharmacological effect at a 15-fold lower concentration than conventional curcumin.

Keywords: curcumin, bioavailability, bio-enhancers, piperine, liposomes, nanoparticles, cyclodextrins.

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

2 – ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

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

2 – Federal Research of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ust'inskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: sokmary@mail.ru

Тел.: 8 (495) 698 53 60

ВВЕДЕНИЕ

Куркума (лат. *Curcuma*) известна всему миру в качестве специи на протяжении тысячелетий. Куркумин [1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-ион] (рисунок 1), также называемый диферулоилметаном, является гидрофобным полифенолом, полученным из корневища растения *Curcuma longa* Linn. (сем. Zingiberaceae), произрастающего на территории Индии и других стран Юго-Восточной Азии. Также известен под названием турмерик. Куркума на протяжении веков широко используется в традиционной индийской медицине, аюрведе. В коммерческом

куркумине содержится примерно 77% диферулоилметана, 17% диметоксикуркумина и 6% бисдиметоксикуркумина [32, с. 141–153].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КУРКУМИНА

В последние годы полифенольные антиоксиданты приобрели большое значение благодаря высокому потенциалу при использовании в качестве профилактических и терапевтических средств при лечении рака, диабета, сердечно-со-

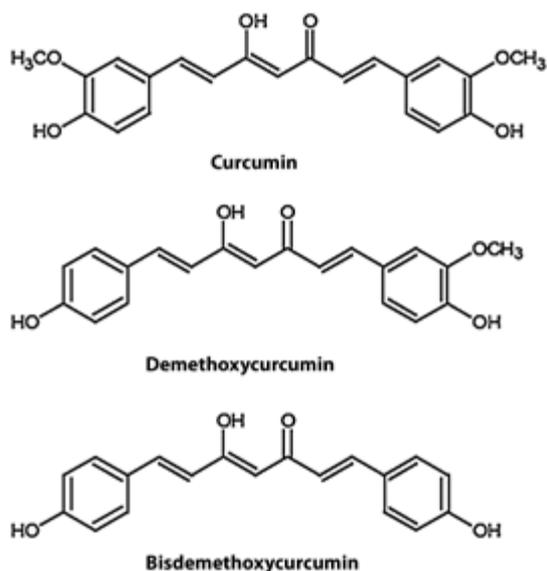


Рисунок 1. Химическая структура куркумина, диметоксикуркумина и бис-диметоксикуркумина

судистых и аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративных расстройств, при старении и ряде других заболеваний [17, с. 189–207].

Куркумин обладает широким спектром фармакологической активности, включая антиоксидантный, антиканцерогенный, противомикробный эффект, проявляет противовоспалительные и антидиабетические свойства (рисунок 2) [45, с. 2–4; 27, с. 1632, 1642–1644; 39, с. 1182–1183; 40, с. 70].

Установлено, что куркумин ингибирует фосфорилирование молекул STAT3, индуцированное интерлейкином IL-6, и вследствие этого – последующую транслокацию ядер молекул STAT3 в различных типах клеточных линий миеломы [2, с. 3863].

Исследования клеточной культуры показали, что куркумин предотвращает продукцию интерлейкинов IL-1 и IL-6, индуцируемых TNF- α (фактор некроза опухоли), путем вмешательства в транскрипционный фактор (NF- κ B) – ядерный фактор «каппа-би» – и сигнальные пути митогенактивируемых киназ (MAPK) [46, с. 3–4, 11; 18, с. 438]. В клеточных линиях микроглии макрофага куркумин также оказывает ингибирующее действие на экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2) и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), что приводит к снижению уровня простагландина E2 (PGE2) и оксида азота (NO) [12, с. 438–441; 69, с. 105–125; 59, с. 21–26]. Кроме того, куркумин снижает выработку TNF- α +IL-1, -2, -8 и -12 в форболмиристатацетат (PMA) или моноцитах, стимулированных липополисахаридами (LPS), и альвеолярных макрофагах в зависимости от концентрации и времени, что свидетельствует о его противовоспалительном действии [73, с. 41–47]. Несмотря на то, что клинические испытания на людях продемонстрировали его активность при онкологических заболеваниях [25, с. 20–22; 56, с. 15954–15964], артрите [6, с. 1719–1725], иммунодефиците [23, с. 19–35] и сердечно-сосудистых заболеваниях [51, с. 80], применение куркумина ограничивается низкой абсорбцией и биодоступностью [48, с. 807–818]. Согласно фармакокинетическим исследованиям было установлено, что куркумин имеет невысокий процент всасывания из кишечника в нижнюю полую вену, а также быстрый метаболизм в печени и элиминацию почками [7, с. 86–92], что ограничивает терапевтическую эффективность куркумина. В результате перорального приёма в крови обнаруживаются следовые количества куркумина, большая его часть выводится с фекалиями. Преобладающими метаболитами в плазме крови после перорального введения куркумина являются глюкурониды и глюкуронидсульфаты. Основным ферментом фармакокинетики куркумина является глюкуронидаза [49, с. 291–299].



Рисунок 2. Фармакологическое действие куркумина

Результаты проведенных исследований на различных моделях животных [67, с. 73–75; 61, с. 124–127] и с участием людей [45, с. 14; 11, с. 10; 4, с. 2895–2900; 21, с. 353–356] доказали, что куркумин безопасен даже в очень больших дозах. Например, три различных клинических исследования I фазы показали, что куркумин, принимаемый в дозе до 12 г в день, хорошо переносится [11, с. 10; 4, с. 2895–2900; 21, с. 353–356].

Таким образом, многочисленные исследования подтверждают эффективность куркумина при различных патологических процессах, однако ограничением применения является его низкая биодоступность. Поэтому одной из важных технологических задач является разработка эффективных лекарственных форм куркумина с целью повышения биодоступности этого соединения.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ КУРКУМИНА

В научных публикациях для повышения биодоступности куркумина используют энхансеры биодоступности, которые способны блокировать метаболические пути куркумина, или включают его в состав наночастиц, липосом, мицелл и фосфолипидных комплексов, которые обеспечивают лучшую проницаемость и устойчивость к метаболическим процессам.

По данным литературных источников, концепция биоэнхансеров возникла в аюрведе и уже давно используется в этой системе медицины. Аюрведа использует в качестве биоэнхансеров биологически активные вещества из растений *Piper longum* Linn., *Zingiber officinale* Rosc. и *Glycyrrhiza glabra* Linn., а также иные методы увеличения биодоступности [62, с. 3–10]. Повышение биодоступности может привести к уменьшению терапевтической дозы основного препарата, снижению токсичности и побочных эффектов, а также к потенцированию эффективности, снижению резистентности, потребности в сырье для производства препаратов и в конечном счете снижению затрат на лечение.

По данным научных публикаций, в качестве биоэнхансера применяется алкалоид пиперин (1 – пиперилпиперидин) (рисунок 3), являющийся основным биологически активным компонентом различных видов перца, в частности перца черного (*Piper nigrum* L.), перца длинного (*Piper longum* L.), перца явского длинного (*Piper retrofractum* Vahl.). Это вещество имеет несколько предполагаемых механизмов действия [29, с. 443–541]:

- ингибирование путей метаболизма лекарственного средства: он действует на ферменты, которые ответственны за метаболизм и деградацию лекарственных веществ. Пиперин ингибирует Р-гликопротеин (Р-gp) человека и цитохром Р450 3А4 (СYP3А4) [52, с. 645–700];

- ингибирование 5-дифосфатглюкуронилтрансферазы [12, с. 258–262; 33, с. 518–524];
- увеличение абсорбции лекарственного вещества в желудочно-кишечном тракте, поскольку обладает сосудорасширяющим действием, что приводит к большей степени перфузии в области всасывания [22, с. 24–26; 67, с. 73–75; 61, с. 124–127; 10, с. 1559–1568];
- стимуляция гамма-глутамилтранспептидазы (GGT): GGT является важным переносчиком аминокислот, обнаруженным в области кишечника, его стимуляция усиливает поглощение аминокислот, которые в конечном счете усиливают абсорбцию лекарственных средств за счет образования конъюгатов с аминокислотой [55, с. 1401–1407];
- действие в качестве рецептора для определенных молекул или повышение чувствительности рецепторов [68, с. 1302–1305].

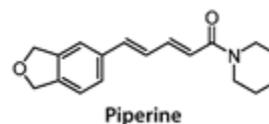


Рисунок 3. Химическая структура пиперина

Нерастворимость в воде и низкая биодоступность куркумина в клетках побудили исследователей к разработке новых рецептур на основе биосовместимых органических веществ и систем доставки, таких как липосомы, полиэтиленгликоли, биополимеры, целлюлоза, кукурузное масло, гидрогели и т. д. [1, с. 1513–1522; 36, с. 1322–1331; 60, с. 2–18]. Сообщалось также о супрамолекулярных соединениях куркумина с циклодекстринами и кукурбитурилом. Эти комплексы показали не только повышение растворимости в воде, но и увеличение биодоступности куркумина. В этих системах куркумин солюбилизируется путем попадания в гидрофобные карманы, главным образом посредством гидрофобных взаимодействий. Интересно, что флуоресценция куркумина усиливается после растворения в любой из этих систем, что позволяет легко оценить эффективность его связывания. Комплексы прошли успешные испытания на противоопухолевую активность в культурах раковых клетках и *in vivo* на животных, продемонстрировавшие значительное увеличение противоопухолевой активности за счет улучшения биодоступности куркумина.

По мнению авторов работы [1, с. 1513–1522], одним из наиболее эффективных способов повышения биодоступности куркумина является его включение в липосомы. Для получения липосомального куркумина использовали методы тонкопленочной дисперсии, замораживания – оттаивания, инъекционного введения, метод обращения фаз и т. д. [66, с. 602–604] (рисунок 4).

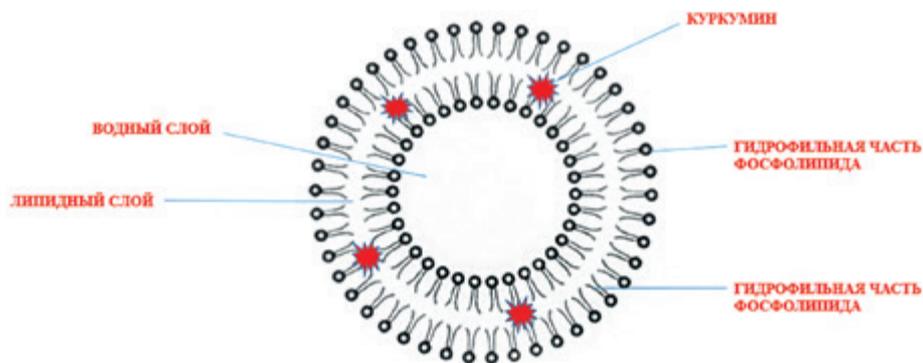


Рисунок 4. Схема включения куркумина в липосому

В докладе Chen и др. [26, с. 100–109] описаны способы получения липосом, содержащих куркумин и покрытых N-триметилхитозанхлоридом, методом тонкопленочной дисперсии. Липосомы получали из соевого фосфатидилхолина, холестерина и D-α-токоферила полиэтиленгликоля-1000 сукцината. Результаты показали, что эффективность захвата, эффективность загрузки, размер частиц и дзета-потенциал липосом с куркумином составляют $86,67 \pm 1,34\%$, $2,33 \pm 0,09\%$, $657,7$ нм и $+15,64$ мВ соответственно. Фармакокинетические параметры липосом с куркумином составляли: $C_{\max} = 46,13$ мкг/л, $t_{1/2} = 12,05$ ч и AUC (площадь под кривой зависимости концентрация – время) = $416,58$ мкг/л·ч соответственно, тогда как для липосом без покрытия: $C_{\max} = 32,12$ мкг/л, $t_{1/2} = 9,79$ ч и AUC = $263,77$ мкг/л·ч. Было продемонстрировано, что введение куркумина в липосомы улучшает его биодоступность.

Gu с соавторами [31, с. 97–100] получали липосомы куркумина с покрытием из карбопола с использованием метода тонкопленочной дисперсии. Эффективность инкапсулирования куркумина составила $88,00 \pm 2,7\%$ и несколько снизилась по сравнению с липосомами без покрытия ($89,21 \pm 2,3\%$). Однако оценка биодоступности липосом с покрытием из карбопола после перорального введения крысам показала, что относительная биодоступность липосом с покрытием составляла 281%, что в 2,22 раза превышало биодоступность липосом с куркумином без покрытия.

Метод тонкопленочной дисперсии дает большие и многослойные везикулы (MLV), которые могут быть обработаны небольшими однослойными везикулами (SUV) $0,25$ – 1 мкм путем воздействия ультразвуком. Sun с соавторами [30, с. 66–72] получали липосомы с куркумином, гидрированным лецитином, холестерином и полиамидаминными (ПАМАМ) дендримерами в соотношении 1:20:3,26:1,6 (об./об.) с использованием метода тонкопленочной ультразвуковой дисперсии. Результаты показали, что средний размер частиц липосом с куркумином составил $97,08$ нм, а эффектив-

ность захвата составляла $99,37 \pm 0,89\%$. Полученные липосомы были стабильны при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

Мицеллы и фосфолипидные комплексы могут улучшить биодоступность куркумина. В работе Liu и др. [5, с. 720–727] показано значительное повышение биодоступности куркумина в комплексе куркумин – фосфолипид. В этом исследовании куркумин (100 мг/кг) и фосфолипидный комплекс куркумина (соответствующий 100 мг/кг куркумина) вводили перорально лабораторным крысам вида *Rattus*. Комплекс куркумин – фосфолипид показал максимальный уровень куркумина в плазме 600 нг/мл через $2,33$ часа после перорального приема в отличие от введения свободного куркумина, имеющего максимальную концентрацию в плазме 267 нг/мл после $1,62$ ч перорального введения.

Нанолипосомы обладают многими преимуществами: пролонгированным высвобождением, целенаправленным действием, низкой токсичностью, стабильностью, высокой биодоступностью и, как следствие, меньшей дозировкой при пероральном приеме препаратов [44, с. 29–50]. Sun с соавторами [71, с. 173–178] использовали для разработки систем наночастиц куркумина хитозан, который широко используется в фармацевтической технологии в качестве полимерного носителя, и триполифосфат в соотношении куркумин : хитозан : триполифосфат = 3:24:8 (м/м). Испытание показало, что средний размер, дзета-потенциал и нагрузка нанолипосом куркумином составляют $110,5 \pm 5,6$ нм, $18,3 \pm 0,7$ мВ и $13,7 \pm 0,12\%$ соответственно. Инкапсуляция достигала $84,2 \pm 2,50\%$. Исследования стабильности показали, что нанолипосомы с куркумином стабильны в течение 10 мес. при температуре 4 °С. После того как крысам вводили нанолипосомы с куркумином *per os* в дозе 100 мг/кг и суспензию куркумина в качестве контроля, анализировали образцы плазмы методом ВЭЖХ. Было обнаружено, что C_{\max} и площадь под кривой нанолипосом с куркумином была больше, чем у суспензии курку-

мина. Кроме того, относительная биодоступность нанолипосом достигла 448%, что свидетельствует о значительном увеличении биодоступности куркумина. Улучшение биодоступности, вероятно, было связано с тем, что хитозан с положительным зарядом продлевает время контакта лекарственного средства с абсорбирующей поверхностью, что приводит к лучшей биодоступности.

В другом исследовании Shin и др. [24, с. 111–119] получали обработанные хитозаном куркуминовые нанолипосомы. Инкапсуляция, размер частиц и дзета-потенциал полученных нанолипосом с 0,1% покрытием из хитозана составляли 54,70%, 101,42 нм и $-14,10$ мВ соответственно. Стабильность нанолипосом оценивали путем измерения изменения среднего размера при 4 и 25 °C в течение 40 дней. Размер частиц измеряли через 1, 3, 5, 7, 15 и 40 дней. Результаты показали, что средний размер незначительно ($P < 0,05$) увеличивался как при 4 °C, так и при 25 °C до 5 дней и немного уменьшался во время хранения, что продемонстрировало удовлетворительную стабильность липосом. Однако инкапсуляция нанолипосом не может предотвратить гидролиз куркумина при pH 12,0, поскольку высокая щелочность вызывает деградацию слоя фосфолипидов нанолипосом, что приводит к быстрой утечке и гидролизу [66, с. 602–604]. В целом нанолипосомы являются одним из доступных методов улучшения стабильности, устойчивого высвобождения и биодоступности куркумина.

Циклодекстрины (ЦД) относятся к классу природных макроциклических олигосахаридов, получаемых из крахмала путем циклизации в присутствии фермента циклогликозилтрансферазы.

Благодаря своей уникальной структуре они способны формировать комплексы соединений включения по типу «гость – хозяин» с различными типами молекул: органическими, неорганическими, металлоорганическими и др. (рисунок 5). В настоящее время

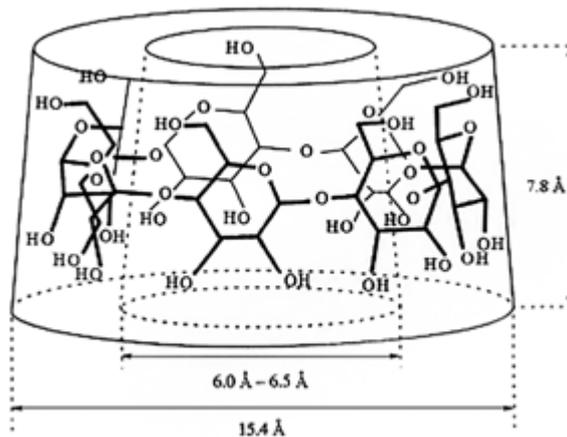


Рисунок 5. Структура циклодекстринов

циклодекстрины и их производные широко используются в адресных системах доставки лекарств в организме, поскольку активные субстанции в комплексах с циклодекстринами обладают улучшенными фармакокинетическими параметрами и приобретают новые свойства, расширяющие область их фармакологического применения.

Обычно β -циклодекстрин используется в качестве инкапсулирующего агента. Проведены исследования влияния γ -циклодекстрина как инкапсулирующего агента. γ -циклодекстрины имеют больший диаметр и более высокую растворимость по сравнению с β -циклодекстрином, полностью усваиваются слюной и гидролизуются панкреатической амилазой. В опытах на животных введение комплекса токотриенол- γ -циклодекстрина приводило к повышению концентрации токотриенола в плазме и тканях за счет усиления абсорбции в кишечнике [58, с. 1452–1457]. В работе Purpura и др. [38, с. 19] исследовали биодоступность новой рецептуры куркумина в комплексе с γ -циклодекстрином. Эта композиция сравнивалась со стандартным образцом куркумина и двумя препаратами куркумина с предполагаемой повышенной биодоступностью: композицией куркумина с фитосомами и композицией куркумина с эфирными маслами. В исследовании принимали участие 12 добровольцев. Концентрацию в плазме отдельных куркуминоидов, которые присутствуют в куркуме, а именно куркумина, деметоксикуркумина и бис-деметоксикуркумина, определяли в начале и через различные промежутки времени после перорального приема. Комплекс куркумина с γ -циклодекстрином показал самые высокие концентрации в плазме куркумина и суммы куркуминоидов, тогда как введение комплекса куркумин – фитосомы приводило к самым высоким уровням бис-деметоксикуркумина. Комплекс куркумина с γ -циклодекстрином показал значительно увеличенную относительную биодоступность (в 39 раз) общих куркуминоидов (AUC_{0-12}) по сравнению со стандартным образцом куркумина. В исследовании, проведенном Kazemi-Lomedasht и др. [20, с. 127–130], было продемонстрировано, что комплекс β -циклодекстрин – куркумин улучшает доставку куркумина в клетки рака молочной железы.

Мезопористые наночастицы кремния (МНК) часто используются при создании наносистем для улучшения биодоступности слабо растворимых в воде лекарств [63, с. 5661–5665; 14, с. 3641–3645; 3, с. 862–871; 28, с. 8373–8377; 13, с. 1616–1620; 16, с. 60–68; 53, с. 9632–9637; 65, с. 602–604; 37, с. 646–654]. Благодаря упорядоченным нанопористым структурам, большой области поверхности, большим объемам пор и высоким поверхностным плотностям гидроксильных групп МНК могут быть легко функционализированы. Они биосовместимы и широко используются в фармацевти-

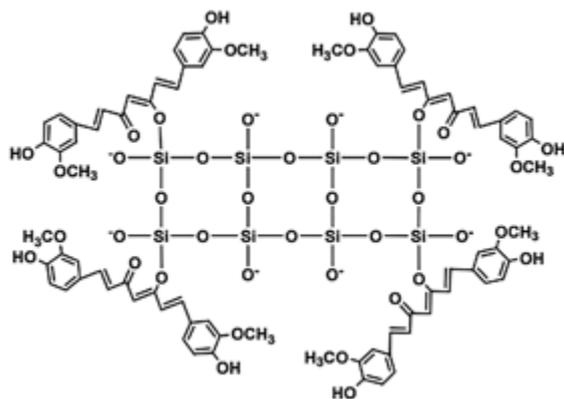


Рисунок 6. Мезопористая кремниевая наночастица куркумина [65]

ческой технологии. Куркумин связывается ковалентно через кремний-кислородную связь в дикето-фрагменте (рисунок 6) [34, с. 291–212]. В работе Ma'Mani и др. [37, с. 646–654] наночастицы кремния использовались для доставки куркумина в клетки рака молочной железы. Средний размер полученных наночастиц кремния и наночастиц с куркумином составлял 60 и 70 нм соответственно. Наночастицы продемонстрировали высокую загрузку, устойчивый профиль высвобождения и высокую противоопухолевую эффективность в клеточных линиях рака человека.

Наночастицы на основе золота находят применение в технологии доставки лекарств, диагностике и лечении рака, других областях биологии и медицины [35, с. 1808–1814; 15, с. 1882–1893; 4, с. 2895–2900; 54, с. 2659–2663]. Для получения золотых наночастиц используют различные методы: дисперсионный (основан на диспергировании металлов) и конденсационный (наночастицы восстановленного металла образуются из ионов соответствующих солей) [74, с. 37–46].

В работе Muddineti и др. [47, с. 32–51] для синтеза наночастиц золота использовались гидрат тетрахлораурата (III) водорода, аскорбиновая кислота и ксантановая смола в качестве восстановителя и стабилизатора соответственно. Водорастворимый куркумин готовили с использованием поливинилпирролидона PVP-K30 в виде твердой дисперсии, загружали в полученные наночастицы золота и оценивали их поглощение клетками и цитотоксичность на клетках меланомы. Результаты показали эффективность полученных наночастиц по сравнению со свободным куркумином. Интерес представляет получение наноконъюгатов куркумина на основе наночастиц кобальта и серебра, которые обладают антимикробной активностью [50, с. 1254–1262; 57, с. 92–97; 70, с. 228–236].

Исследователей привлекают магнитные наночастицы, где в основном используется оксид железа в качестве средства доставки лекарственных средств и

контрастные агенты для изображения магнитного резонанса [41, с. 1471–1480; 42, с. 1761–1779; 43, с. 1890–1905]. В исследовании Yallari и др. готовили композицию магнитных наночастиц, загруженных куркумином (МНЧ с куркумином), и оценивали терапевтическую эффективность этой композиции на модели рака поджелудочной железы. МНЧ с куркумином эффективно ингибировали рост раковых клеток поджелудочной железы человека (HPAF-II), а также подавляли рост опухоли поджелудочной железы на модели ксенотрансплантата HPAF-II мышей и повышали выживаемость мышей за счет замедления роста опухоли [70, с. 228–236; 41, с. 1471–1480; 42, с. 1761–1779; 43, с. 1890–1905].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на низкую биодоступность куркумина, обзор данных литературных источников о проведенных исследованиях показывает, что куркумин обладает терапевтической эффективностью по отношению к различным заболеваниям человека, включая рак, диабет, артрит, сердечно-сосудистые и неврологические заболевания. Для улучшения биодоступности куркумина ученые предлагают различные методы. Они включают использование энхансеров, соединений, способствующих доставке биологически активных веществ, таких как алкалоид пиперин, который препятствует глюкуронидации; включение куркумина в липосомы и наночастицы; использование комплекса куркумин – фосфолипид, комплексов с циклодекстринами и др. Увеличение биодоступности куркумина в ближайшем будущем, вероятно, выведет его на первый план в качестве препарата из растительного сырья для лечения заболеваний человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kunwar B., Barik A., Pandey R., Priyadarsini K. I. Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study // *Biochim. Biophys. Acta (Gen.)*. 2006. V. 1760. P. 1513–1522.
2. Bharti A. C., Donato N., Aggarwal B. B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells // *J Immunol*. 2003. V. 171(7). P. 3863–3871.
3. Dinda A. K., Prashant C. K., Naqvi S. Curcumin loaded organically modified silica (ORMOSIL) nanoparticle: A novel agent for cancer therapy // *Int. J. Nanotechnol*. 2012. V. 9. P. 862–871.
4. Cheng A. L., Hsu C. H., Lin J. K., Hsu M. M., Ho Y. F., Shen T. S., Ko J. Y., Lin J. T., Lin B. R., Ming-Shiang W., Yu H. S., Jee S. H., Chen G. S., Chen T. M., Chen C. A., Lai M. K., Pu Y. S., Pan M. H., Wang Y. J., Tsai C. C., Hsieh C. Y. Phase I Clinical Trial of Curcumin, a Chemopreventive Agent, in Patients with High-Risk or Pre-Malignant Lesions // *Anticancer Research*. 2001. V. 21. P. 2895–2900.
5. Liu A., Lou H., Zhao L., Fan P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. V. 40 (3). P. 720–727.
6. Chandran C., Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis // *Phytother Res PTR*. 2012. V. 26(11). P. 1719–1725

7. Wahlstrom C., Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat // *ActaPharmacolToxicol* (Copenh). 1978. V. 43(2). P. 86–92.
8. Millington C., Sonogo S., Karunaweera N., Rangel A., Aldrich-Wright J. R., Campbell I. L., Gyengesi E., Munch G.. Chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease: new perspectives on animal models and promising candidate drugs // *Biomed Res Int*. 2014. V. 2014. P. 32–34.
9. Sreelakshmi C., Goel N., Datta K. K. R., Ad-dlagatta A., Ummani R., Reddy B. V. S. Green synthesis of curcumin capped gold nanoparticles and evaluation of their cytotoxicity // *Nanosci. Nanotechnol. Lett*. 2013. V. 5. P. 1258–1265.
10. Lao C. D., Demierre M. F., Sondak V. K. Targeting Events Inmelanoma Carcinogenesis for the Prevention of Melanoma // *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2006. V. 6. P. 1559–1568.
11. Lao C. D., Ruffin M. T., Normolle D., Heath D. D., Murray S. I., Bailey J. M., Boggs M. E., Crowell J., Rock C. L., Brenner D. E. Dose Escalation of a Curcuminoid Formulation // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006. V. 6. P. 10.
12. Atal C. K., Dubey R. K., Singh J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: Evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism // *J PharmacolExpTher*. 1985. V. 232. P. 258–262.
13. Jin D., Lee J., Seo M. L., Jaworski J., Jung J. H. Controlled drug delivery from mesoporous silica using a pH response release // *New J. Chem*. 2012. V. 36. P. 1616–1620.
14. Jin D., Park K.-W., Lee J. H., Song K., Kim J.-G., Seo M. L., Jung J.H. The selective immobilization of curcumin onto the internal surface of mesoporous hollow silica particles by covalent bonding and its controlled release // *J. Mat. Chem*. 2011. V. 21. P. 3641–3645.
15. Singh D. K., Jagannathan R., Khandelwal P., Abraham P. M., Poddar P. In situ synthesis and surface functionalization of gold nanoparticles with curcumin and their antioxidant properties: An experimental and density functional theory investigation // *Nanoscale*. 2013. V. 5. P. 1882–1893.
16. Patra D., Sleem F. A new method for pH triggered curcumin release by applying poly(l-lysine) mediated nanoparticle-congregation // *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 795. P. 60–68.
17. Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., M. N. V. Ravi. Kumar. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective // *J. Control. Rel*. 2006. V. 113. P. 189–207.
18. Hansen, M. Krautwald, Maczurek A. E., Stuchbury G., Fromm P., Steele M., Schulz O., Garcia O. B., Castillo J., Korner H., Munch G. A versatile high throughput screening system for the simultaneous identification of anti-inflammatory and neuroprotective compounds // *J Alzheimer's Dis*. 2010. V. 19(2). P. 438–441.
19. Liliemark E., Liliemark J., Källberg N., Björkholm M., Sjöström B., Peterson C.. Studies of the organ distribution in mice of teniposide liposomes designed for treatment of diseases in the mononuclear phagocytic system // *Pediatr Res*. 1995. V. 38(1). P. 7–10.
20. Kazemi-Lomedasht, Rami A., Zarghami N. Comparison of Inhibitory Effect of Curcumin Nanoparticles and Free Curcumin in Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Expression in Breast Cancer // *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013. V. 3(1). P. 127–130.
21. Shoba, Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P. S. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers // *Planta Medica*. 1998. V. 64(4). P. 353–356.
22. Dudhatra G. B., Mody S. K., Awale M. M., Patel H. B., Modi C. M., Kumar A. et al. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of herbal bioenhancers // *Scientific World Journal*. 2012. V. 2012. P. 24–26.
23. Jagetia G.C., Aggarwal B.B. «Spicing up» of the immune system by curcumin // *J ClinImmunol*. 2007. V. 27(1). P. 19–35.
24. Shin G. H., Chung S. K., Kim J. T., Joung H. J., Park H. J. Preparation of chitosan-coated nanoliposomes for improving the mucoadhesive property of curcumin using the ethanol injection method // *J Agric Food Chem*. 2013. V. 61(46). P. 111–119.
25. Asher G. N., Spelman K. Clinical utility of curcumin extract // *Altern Ther Health Med*. 2013. V. 19(2). P. 20–22.
26. Chen, Wu J., Sun M. et al. N-trimethyl chitosan chloride-coated liposomes for the oral delivery of curcumin // *J Liposome Res*. 2012. V. 22(22). P. 100–109.
27. Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F. M., Torti S. V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials // *CellMol Life Sci CMLS*. 2008. V. 65(11). P. 1632, 1642–1644.
28. Yan H., The C., Sreejit S., Zhu L., Kwok A., Fang W., Ma X., Nguyen K. T., Korzh V., Zhao Y. Functional mesoporous silica nanoparticles for photothermal-controlled drug delivery // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012. V. 51. P. 8373–8377.
29. Bharat, Somdatt G. Bio-potential using herbs: Novel Technique for poor bioavailable drugs // *Int J PharmTech Res*. 2014. V. 6. P. 443–541.
30. Sun, Han M.. Preparation of novel curcumin liposomes and associated preliminary stability study // *World Sci Technol*. 2008. V. 10(4). P. 66–72.
31. Gu J. J., Deng Y. J. Preparation of curcumin liposomes and its oral pharmacokinetics in rats // *J Chengdu Med Coll*. 2010. V. 5(2). P. 97–100.
32. Jurenka J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma Longa*: A review of preclinical and clinical research // *Alternative Medicine Review*. 2009. V. 14 (2). P. 141–153.
33. Berginc, Trontelj J., Basnet N. S., Kristl A. Physiological barriers to the oral delivery of curcumin // *Pharmazie*. 2012. V. 67(6). P. 518–524.
34. Priyadarsini K. I.. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 291–212.
35. Sindhu K., Rajaram A., Sreeram K. J., Rajaram R.. Curcumin conjugated gold nanoparticle synthesis and its bioavailability // *RSC Adv*. 2014. V. 4. P. 1808–1814.
36. Li, Braiteh F.S., Kurzrock R.. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis // *Cancer*. 2005. V. 104. P. 1322–1331.
37. Ma'Mani L., Nikzad S., Kheiri-Manjili H., Al-Musawi S., Saeedi M., Askaralou S. Curcumin-loaded guanidine functionalized PEGylated mesoporous silica nanoparticles KIT-6: Practical strategy for the breast cancer therapy // *Eur. J. Med. Chem*. 2014. V. 83. P. 646–654.
38. Purpura, Lowery R. P., Wilson J. M., Mannan H., Münch G., Razmovski-Naumovski V. Analysis of different innovative formulations of curcumin for improved relative oral bioavailability in human subjects // *Eur J Nutr*. 2017. P. 19.
39. Venigalla M., Gyengesi E., Munch G. Curcumin and Apigenin—novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease // *Neural Regen Res*. 2015. V. 10(8). P. 1182–1183.
40. Venigalla M., Sonogo S., Gyengesi E., Sharmam M.J., Munch G. Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease // *Neurochem Int*. 2016. V. 95. P. 70–77.
41. Yallapu M. M., Ebeling M. C., Khan S., Sundaram V., Chauhan N., Gupta B. K., Puumala S. E., Jaggi M., Chauhan S. C. Novel curcumin-loaded magnetic nanoparticles for pancreatic cancer treatment // *Mol. Cancer Ther*. 2013. V. 12. P. 1471–1480.
42. Yallapu M. M., Othman S. F., Curtis E. T., Bauer N. A., Chauhan N., Kumar D., Jaggi M., Chauhan S.C.. Curcumin loa-

- ded magnetic nanoparticles for breast cancer therapeutics and imaging applications // *Int. J. Nanomed.* 2012. V. 7. P. 1761–1779.
43. Yellapu M. M., Shadi F. O., Curtis E. T. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 1890–1905.
 44. Mozafari M. R. Nanoliposomes: preparation and analysis // *Methods Mol Biol.* 2010. V. 605(605). P. 29–50.
 45. Wojcik M., Krawczyk M., Wojcik P., Cypryk K., Wozniak L. A. Molecular Mechanisms Underlying Curcumin-Mediated Therapeutic Effects in Type 2 Diabetes and Cancer // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* V. 2018, Article ID 9698258. P. 14.
 46. Karunaweera, Raju R., Gyengesi E., Munch G. Plant polyphenols as inhibitors of NF-kappaB induced cytokine production—a potential anti-inflammatory treatment for Alzheimer's disease? // *Front. Mol. Neurosci.* 2015. V. 8. P. 3–4, 11.
 47. Muddineti O. S., Kumari P., Ajarapu S., Lakhani P. M., Bahl R., Ghosh B., Biswas S. Xanthan gum stabilized PEGylated gold nanoparticles for improved delivery of curcumin in cancer // *Nanotechnology.* 2016. V. 27. P. 32–51.
 48. Anand, Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises // *MolPharm.* 2007. V. 4(6). P. 807–818
 49. Ravichandran. Pharmacokinetic study of nanoparticulate curcumin: oral formulation for enhanced bioavailability // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.* 2013.V. 4. P. 291–299.
 50. Sakey, Bafubiandi-Mulaba A. F., Rajnikanth V., Varaprasad K., Reddy N. N., Raju K. M. Development and characterization of curcumin loaded silver nanoparticle hydrogels for antibacterial and drug delivery applications // *J. Inorg. Organomet. Polym. Mat.* 2012. V. 22. P. 1254–1262.
 51. DiSilvestro R. A., Joseph E., Zhao S., Bomser J. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people // *Nutr J.* 2012. V. 11. P. 80.
 52. Bhardwaj R. K., Glaeser H., Becquemont L., Klotz U., Gupta S. K., Fromm M. F. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4 // *J PharmacolExpTher.* 2002. V. 302. P. 645–700.
 53. Gangwar R. K., Tomar G. B., Dhumale V. A., Zinjarde S., Sharma R. B., Datar S. Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. P. 9632–9637.
 54. Gangwar R. K., Dhumale V. A., Kumari D., Nakate U. T., Gosavi S. W., Sharma R. B., Kale S. N., Datar S. Conjugation of curcumin with PVP capped gold nanoparticles for improving bioavailability // *Mater. Sci. Eng. C.* 2012. V. 32. P. 2659–2663.
 55. Johri R. K., Thusu N., Khajuria A., Zutshi U. Piperine mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial cells: Status of gamma glutamyltranspeptidase activity, uptake of amino acid and lipid peroxidation // *Biochem Pharmacol.* 1992. V. 43. P. 1401–1407.
 56. Bhattacharyya R. J., Mandal D., Saha B., Sen G. S., Das T., Sa G.. Curcumin prevents tumor-induced T-cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction // *J BiolChem.* 2007. V. 282(22). P. 15954–15964.
 57. Hatamie, Nouri M., Karandikar S. K., Kulkarni A., Dhole S. D., Phase D. M., Kale S. N. Complexes of cobalt nanoparticles and polyfunctional curcumin as antimicrobial agents // *Mat. Sci. Eng. C.* 2012. V. 32. P. 92–97.
 58. Ikeda S., Uchida T., Ichikawa T., Watanabe T., Uekaji Y., Nakata D., Terao K., Yano T. Complexation of tocotrienol with gamma-cyclodextrin enhances intestinal absorption of tocotrienol in rats // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010. V. 74(7). P. 1452–1457.
 59. Lev-Ari S., Maimon Y., Strier L., Kazanov D., Arber N. Down-regulation of prostaglandin E2 by curcumin is correlated with inhibition of cell growth and induction of apoptosis in human colon carcinoma cell lines // *J Soc Integr Oncol.* 2006. V. 4(1). P. 21–26.
 60. Prasad S., Tyagi A. K., Aggarwal B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice // *Cancer Res. Treat.* 2014. V. 46. P. 2–18.
 61. Qureshi S., Shah A. H., Ageel A. M. Toxicity Studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa* // *Planta Medica.* 1992. V. 58. P. 124–127.
 62. Singh S., Tripathi J. S., Rai N. P. An appraisal of the bioavailability enhancers in Ayurveda in the light of recent pharmacological advances. // *Ayu.* 2016. 37(1). P. 3–10.
 63. Chin S. F., Iyer K. S., Saunders M., Tim G., Buckley C., Paskevicius M., Aston C. L. Encapsulation and sustained release of curcumin using superparamagnetic silica reservoirs // *Chemistry.* 2009. V. 15. P. 5661–5665.
 64. Johnson S. M., Bangham A. D., Hill M. W. et al. Single bilayer liposomes // *Biochim Biophys Acta.* 1971. V. 233(233). P. 820–826.
 65. Singh S. P., Sharma M., Gupta P. K. Enhancement of phototoxicity of curcumin in human oral cancer cells using silica nanoparticles as delivery vehicle // *Lasers Med. Sci.* 2014. V. 29. P. 645–652.
 66. Feng, Wei Y., Lee R.J., Zhao L. Liposomal curcumin and its application in cancer // *International Journal of Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 602–604.
 67. Shankar T. N., Shantha N. V., Ramesh H. P., Murthy I. A., Murthy V. S. Toxicity Studies on Turmeric (*Curcuma longa*): Acute toxicity Studies in Rats, Guinea pigs & Monkeys // *Indian Journal of Experimental Biology.* 1980. V. 18. P. 73–75.
 68. Balakrishnan V., Varma S., Chatterji D. Piperine augments transcription inhibitory activity of rifampicin by several fold in *Mycobacterium smegmatis* // *Curr Sci.* 2001. V. 80. P. 1302–1305.
 69. Menon V. P., Sudheer A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin // *Adv Exp Med Biol.* 2007. V. 595. P. 105–125.
 70. Chen W. S., Xu N., Xu L., Wang L., Li Z., Ma W., Zhu Y., Xu C., Kotov N. A. Multifunctional magnetoplasmonic nanoparticle assemblies for cancer therapy and diagnostics (Theranostics) // *Macromol. Rapid Comm.* 2010. V. 31. P. 228–236.
 71. Sun W. T., Zou Y., Guo Y.P. et al. Construction and characterization of curcumin nanoparticles system // *J Nanopart Res.* 2014. V. 16(3). P.173–178.
 72. Wang X. Y., Ishida T., Ichihara M., Kiwada H. Influence of the physicochemical properties of liposomes on the accelerated blood clearance phenomenon in rats // *J Control Release.* 2005. V. 104(1). P. 91–102.
 73. Wabe X. X., Hashimoto S., Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages // *Pharmacol Res Off J Italian Pharmacol Soc.* 1999. V. 39(1). P. 41–47.
 74. Бычковский П. М., Кладиев А. А., Солomeвич С. О., Щеголев С. Ю. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение // *Российский биотерапевтический журнал.* 2011. № 3. С. 37–46. [Bychkovskii P. M., Kladiyev A. A., Solomevich S.O., Shchegolev S. Yu. Zolotyie nanochastitsy: sintez, svoystva, biomeditsinskoe primenenie // *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal.* [Gold nanoparticles: synthesis, properties, biomedical applications // *Russian biotherapeutic journal.*] 2011. № 3. S. 37–46.]

УДК 615.451.16

ПОЛИЭКСТРАКЦИЯ ТРАВЫ ЭХИНАЦЕИ СИСТЕМАМИ ЭКСТРАГЕНТОВ С ВОЗРАСТАЮЩЕЙ ПОЛЯРНОСТЬЮ

В. А. Вайнштейн^{1*}, И. Е. Каухова¹, П. С. Амелина¹, Ю. А. Колдашова¹, С. А. Минина¹, А. В. Иванова¹

Резюме. Разработан процесс экстрагирования травы эхинацеи (*Echinacea Moench*) последовательно рядом водно-спиртовых растворов с концентрацией спирта 70, 40 и 20%. Экстрагирование проводили в режиме вакуумного кипения с периодическими пульсациями вакуума. Такой режим обеспечил высокую скорость процесса и возможность извлечения как липофильных (производные хлорофилла, каротиноиды), так и гидрофильных (цикориевая кислота и ее производные) БАВ. Изучена кинетика извлечения БАВ на трех стадиях мацерации: цикориевая кислота извлекается полярным экстрагентом на всех стадиях экстрагирования; липофильные компоненты переходят в извлечение на стадии обработки спиртом 70%. Методом микропрепаративной тонкослойной хроматографии с элюированием и СФ-анализом элюатов определены группы извлекаемых БАВ. Проведено сравнение сухих экстрактов, получаемых экстрагированием водой, спиртом 24% и рядом экстрагентов с последовательно возрастающей полярностью. Установлено, что способ полиэкстракции позволяет получить продукт, содержащий наиболее широкий спектр БАВ эхинацеи.

Ключевые слова: природные иммуномодуляторы, трава эхинацеи, экстрагирование, УФ-спектроскопия, ТСХ, цикориевая кислота, эхинакозид.

POLYEXTRACTION OF HERBS OF ECHINACEA BY SYSTEMS OF EXTRACENTS WITH RISING POLARITY

V. A. Vainshtein^{1*}, I. E. Kauhova¹, P. S. Amelina¹, Yu. A. Koldashova¹, S. A. Minina¹, A. V. Ivanova¹

Abstract. The process of extracting the Echinacea herbs (*Echinacea Moench*) has been developed with a series of water-alcohol solutions with an alcohol concentration of 70%, 40%, 20%. Extraction was carried out in the vacuum boiling mode with periodic pulsations of the vacuum. Such a regime provided high speed of the process and the possibility of extracting both lipophilic (chlorophyll derivatives, carotenoids) and hydrophilic (chicory acid and its derivatives) BAS. The kinetics of BAS extraction at three stages of maceration was studied: chicory acid is extracted by the polar extractant at all stages of extracting; the lipophilic components pass into the extraction at the stage of treatment with an alcohol concentration of 70%. Method of micropreparative thin-layer chromatography with eluting and UV-analysis of the eluates was used to determine the groups of extractable BAS. A comparison of dry extracts obtained by water extraction, 24% alcohol extraction and extraction of a number of extractants with sequentially increasing polarity was made. It is established that the method of polyextraction allows to obtain a product containing the widest spectrum of BAS Echinacea.

Keywords: natural immunomodulators, herb echinacea, extraction, UV spectroscopy, TLC, chicory acid, echinacoside.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare, 14/A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: victor.vainshtein@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Эхинацея как лекарственное растительное сырье, известное эффективными иммуномодулирующим, противовоспалительным и противомикробным действиями, широко используется в фармацевтической и медицинской практике и представляет значительный интерес для научных исследований по созданию новых препаратов на ее основе [1–3, 10].

Достаточно широко известны и применяются в современной медицине препараты эхинацеи, в частности рода *Echinacea Moench*. Тем не менее постоянно возрастает интерес к разработке и использованию лекарственных препаратов и БАД на основе эхинацеи, что обусловлено широ-

ким спектром состава и лечебных свойств этого растения [1–3, 9, 10].

Фармакологическую активность эхинацеи определяют:

– **фенолкарбоновые кислоты и их производные:** цикориевая кислота (2,3-О-дикофеилвинная, далее **ЦК**) (рисунок 1), эхинакозид (гликозид 2,3-О-дикофеилвинной кислоты) (рисунок 2), кофейная, каффаровая и хлорогеновая кислоты (рисунок 3), цинарин;

– **флавоноиды:** лютеолин и лютеолин-7-гликозид, кемпферол и его 3-гликозид и 3-рутинозид, кверцетин и его 3-гликозид, 3-ксилозид, 3-арабинозид и другие;

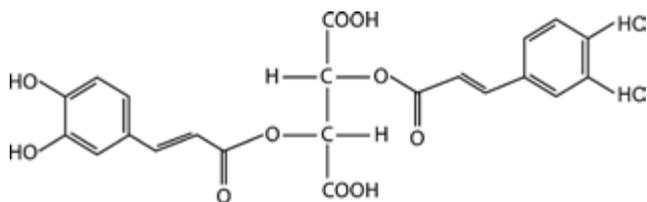


Рисунок 1. Структурная формула цикориевой кислоты

– **полисахариды и их олигомеры**, в частности инулин и фруктаны, содержание которых в корнях может достигать 5,9%;

– **ненасыщенные углеводороды (полиены)**, входящие в состав эфирного масла: эхинолон (10-Е-гидрокси-4,10-диметил-4,11-додекадиен-2-он), 1-пентадецен, 1,8Z-пентадекадиен;

– **алкиламиды ненасыщенных кислот**, в частности эхинацеин (изобутиламид додека-2E,6Z,8E,10E-тетраеновой кислоты), изобутиламиды додека-2E,4E,8Z,10E-тетраеновой и додека-2E,4E,8Z,10Z-тетраеновой кислот;

– **пигменты**, которые проявляют биологическую активность в комплексе с другими БАВ, в частности сумма хлорофиллов (далее СХ), а также некоторые каротиноиды.

Основным БАВ группы кофейных кислот эхинацеи является **цикориевая кислота (ЦК)**. Её максимальное количество содержится в эхинацее пурпурной и колеблется от 0,2 до 1,29%, причем соцветия и листья содержат ЦК больше, чем корни и стебли. Количество ЦК даже в пределах одного вида может варьироваться в зависимости от возраста растений, продолжительности их культивирования и фазы вегетации. **Эхинакозид** обладает бактерицидной активностью в отношении золотистого стафилококка, стрептококка, гипотензивными и анальгетическими свойствами. В конце 1980-х годов в Германии были запатентованы экстракты эхинацеи с содержанием цикориевой кислоты, обладающей иммуностимулирующими свойствами.

Биологическая активность отдельно взятых очищенных компонентов эхинацеи незначительна. Лечебный эффект суммарных извлечений эхинацеи – настоек, экстрактов, консервированного сока – более

высокий, чем у индивидуальных веществ. В наибольшей степени иммуномодулирующие, противовирусные, репаративные, противовоспалительные свойства проявляет суммарный (нативный) комплекс БАВ эхинацеи, близкий к природному составу растения, например сок травы эхинацеи [4, 7].

Выпускаемые из неё препараты представляют собой извлечения из всех частей как свежего, так и высушенного растения. На сегодняшний день зарегистрированы и выпускаются более десяти наименований различных лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе эхинацеи отечественных и зарубежных производителей [11].

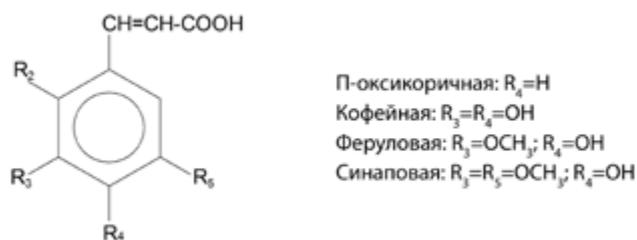


Рисунок 3. Структурные формулы оксикоричных (фенолкарбоновых) кислот и некоторых их производных

Создание суммарных (галеновых) препаратов является дополнением, а иногда альтернативой созданию индивидуальных, так как нативные комплексы БАВ обладают широким спектром действия и меньшей токсичностью для организма, являясь природным, естественным, сбалансированным состоянием действующих веществ [6, 11].

В технологии фитопрепаратов известны полиэкстракты (полифракционные экстракты) – суммарные препараты, полученные путем последовательного экстрагирования ЛРС несколькими системами экстрагентов, например с возрастающей полярностью. Из полученных извлечений получают полиэкстракт, обладающий широким спектром фармакологической активности.

Целью настоящего исследования является получение и характеристика полиэкстракта травы эхинацеи, содержащего широкий спектр БАВ, предназначенного для лечения и профилактики простудных заболеваний и вирусных инфекций.

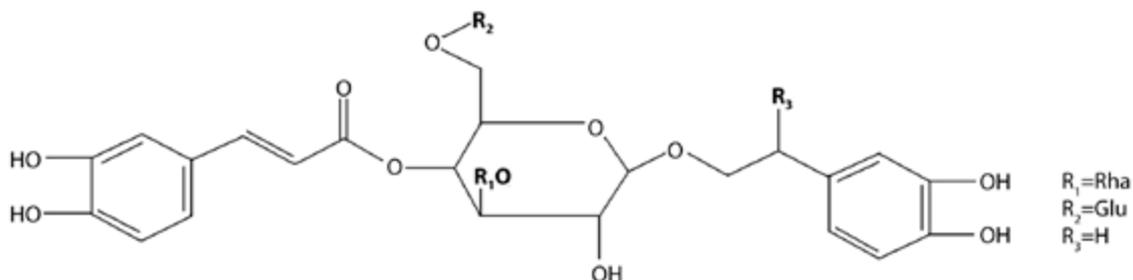


Рисунок 2. Структурная формула эхинакозида

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы и оборудование

- спектрофотометр СФ-2000;
- весы аналитические Adventurer, диапазон измерений 0,1 мг – 210 г;
- весы препаративные Adventurer, диапазон измерений 0,01 – 510 г;
- роторно-вакуумный испаритель;
- эксикатор вакуумный;
- электроплитка с закрытым обогревом;
- водяная баня;
- сушильный шкаф ШС-80-01 СПУ;
- установка для проведения экстракции в режиме вакуумного кипения (колба с обратным холодильником и подводом вакуума, обогреваемая на водяной бане);
- комплект для ТСХ «Ленхром»: термостол для ТСХ, пластинки «Сорбфил» ПТСХ-АФ; камеры стеклянные, ультрафиолетовый кабинет-облучатель 254/365.

Основным материалом исследования в данной работе являлась трава эхинацеи сухая.

Реактивы

- спирт этиловый ректификованный (ГОСТ Р 5165252-2000);
- вода очищенная (ФС 42-2619-97);
- хлороформ (ГОСТ 3160-51);
- н-бутанол (ГОСТ 6006-78);
- уксусная кислота ледяная (х.ч., ГОСТ 61-75);
- ацетон (ГОСТ 2603-79);
- раствор аммиака водный (ч.д.а., ГОСТ 3760-79);
- серная кислота (ч.д.а., ГОСТ 4202-77);
- н-гексан (ГОСТ 5542-87);
- метанол;
- алюминия хлорид;
- квасцы железоммонийные;
- железо(+3) хлорное.

Физико-химические методы анализа. ТСХ (качественная, микропрепаративная с элюированием, обнаружение)

Качественный анализ сухого полиэкстракта эхинацеи (далее СПЭ) методом ТСХ.

Подготовка проб

Во флакон с герметичной пробкой емкостью 20 мл вносили навеску сухого экстракта массой около 0,1 г (точная навеска). Приливали 5,0 мл хлороформа, 10,0 мл воды, закрывали пробкой и перемешивали встряхиванием в течение 2 часов. Фазы разделяли отстаиванием. Нижнюю хлороформенную фазу (**раствор А**) использовали для анализа липофильной фракции, верхнюю водную (**раствор Б**) – для анализа оксикоричных кислот и полисахаридов.

Липофильная фракция

На пластину «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили в точку 40–50 мкл раствора А. Хроматографировали восходящим способом в заранее приготовленной и насыщенной камере в системе растворителей гексан : ацетон (7:3).

После прохождения фронта системы до 5–10 мм от края пластинки ее извлекали, отмечали линию фронта и подсушивали в вытяжном шкафу.

Пластинку просматривали в видимом свете и наблюдали шесть разделившихся пятен: три темно-зеленых (в области $R_f=0,4-0,65$, производные хлорофиллов разной полярности), из которых одно не сдвигалось со стартовой линии, два желто-зеленых и одно ярко-желтое. Для сдвига пятна со старта эту же пластину помещали в систему растворителей хлороформ : метанол : уксусная кислота (4:0,5:0,1) на 1–2 мин, вынимали и подсушивали в вытяжном шкафу (рисунки 9, 10, 11).

Микропрепаративная хроматография липофильной фракции с элюированием и спектроскопией элюатов

На линию старта пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили полосой 400–500 мкл раствора А. Хроматографировали по методике, описанной выше. Получали пластинку с разделившимися шестью полосами. Нумеровали полосы на пластинке сверху вниз (рисунок 12). Вырезали каждую полосу по контуру, измельчали, помещали в отдельные флаконы, приливали по 5 мл спирта, перемешивали встряхиванием в течение часа. Полученные элюаты фильтровали через фильтр с величиной пор 0,45 мкм (Millipore), помещали в кварцевые кюветы толщиной 1 см. Записывали УФ-спектр в диапазоне от 250 до 700 нм на спектрофотометре СФ-2000 (рисунок 13). Полученные спектры соотносили с данными в литературе и делали выводы по составу липофильной фракции СПЭ.

Гидрофильная фракция

На пластину «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили в точку 5–10 мкл раствора Б. Хроматографировали восходящим способом в системе растворителей н-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:1).

После прохождения фронта системы до 10–15 мм от края пластинки ее вынимали, отмечали линию фронта и подсушивали в вытяжном шкафу 15–20 минут (рисунок 14). Делали 3–4 одинаковых пробы для различных способов детекции. Пластинки просматривали в УФ-свете при 365 нм. На темном фоне наблюдали 2 голубых пятна: с $R_f=0,25-0,35$ (эхинакозид) и с $R_f=0,45-0,55$ (цикориевая кислота). Пластинку 1 окунали в 5% раствор хлорного железа в 50% спирте и подсушивали на воздухе. Наблюдали два темно-серых пятна с теми же значениями R_f , причем верхнее пятно (цикориевая кислота) имело более темный оттенок, чем нижнее (эхинакозид). Для пластинки 2 использовали обнаружение пятен в парах аммиака, наблюдали такие же пятна с теми же значениями R_f , бежево-розоватого оттенка. Интенсивность цвета верхних пятен была сильнее, чем нижних. Пятна на пластинке 3 обнаруживали с помощью серной кислоты: окунали в 30% раствор серной кислоты в 50% спирте, вынимали, ополаскивали водой и выдерживали в сушильном шкафу при 120 °С. Наблюдали темно-серое пятно с $R_f=0,45-0,55$ (цикориевая кислота), темно-серое пятно меньшей интенсивности с $R_f=0,25-0,35$ (эхинакозид) и черное продолговатое пятно в области с $R_f=0,01-0,25$ (полисахариды и олигосахариды).

Количественное определение оксикоричных кислот методом спектроскопии: а) в жидких извлечениях; б) в сухих экстрактах.

А) Определение оксикоричных кислот в жидких извлечениях (в пересчете на цикориевую кислоту). Во флаконы с пробками отбирали пробы жидких последовательных извлечений эхинацеи.

0,25 мл жидкого извлечения вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой до метки, получая разбавление в 200 раз. Записывали УФ-спектры разведения в диапазоне от 250 до 350 нм. Полученные спектры имели максимум поглощения при 325 ± 5 нм и плечо в интервале от 295 до 310 нм (рисунок 4). Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны максимума в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту в жидком извлечении рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{цк}} = \frac{D \cdot V_2}{v \cdot 782},$$

где $C_{\text{цк}}$ – концентрация цикориевой кислоты в растворе, %; D – оптическая плотность при максимуме в области 325 нм; V_2 – объем разведенного раствора, мл; v – объем пробы раствора (фильтрованного), мл; 782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты в воде при 325 нм.

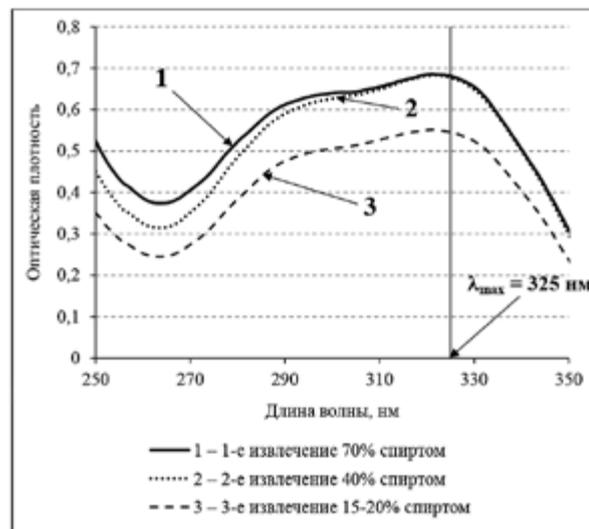


Рисунок 4. Электронные спектры цикориевой кислоты и эхинакозида в трех последовательных извлечениях эхинацеи пурпурной из раствора Б

Б) Определение оксикоричных кислот (цикориевой кислоты и эхинакозида) в сухих экстрактах. 0,5 мл раствора Б вносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили объем до метки водой очищенной.

Снимали УФ-спектр в диапазоне от 250 до 350 нм на спектрофотометре СФ-2000. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны максимума. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту и сухой экстракт в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 0,5 \cdot 782 \cdot (100 - w)} = \frac{D \cdot 100000}{m \cdot 782 \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески экстракта, г; w – потеря в массе при высушивании испытуемого экстракта, %; 782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты при 325 нм.

Количественное определение суммы хлорофиллов: а) в жидких извлечениях, б) в сухих экстрактах.

А) Определение суммы хлорофиллов в жидких экстрактах (в пересчете на феофитин). 0,5 мл жидкого извлечения вносили в мерную колбу объемом 10 мл, доводили спиртом до метки, получая разбавление в 20 раз. Записывали УФ-спектры разведения в диапазоне от 350 до 700 нм. Полученные спектры имели максимум поглощения при 410 ± 5 и 665 ± 5 нм (рисунок 5). Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны максимума 665 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт.

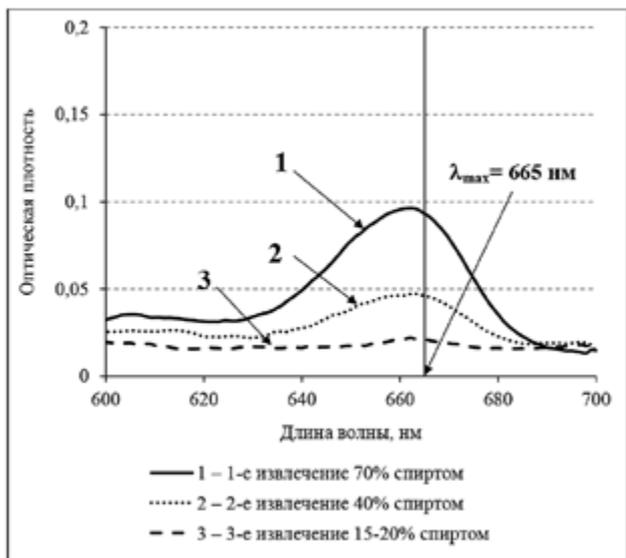


Рисунок 5. Электронные спектры поглощения в трех последовательных извлечениях эхинацеи пурпурной в спирте 95%, полученные из раствора А

Содержание суммы хлорофиллов в пересчете на феофитин в жидком извлечении рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{хл}} = \frac{D \cdot V_1 \cdot 1000}{v \cdot 755},$$

где $C_{\text{хл}}$ – концентрация суммы хлорофиллов в растворе в пересчете на феофитин, мг%; D – оптическая плотность при максимуме в области 665 нм; V_1 – объем разведенного раствора, мл; v – объем пробы раствора (фильтрата после растворения навески и фильтрования раствора), мл; 755 – удельный показатель поглощения суммы хлорофиллов в спирте при 665 нм; 1000 – коэффициент пересчета в мг%.

Б) Определение суммы хлорофиллов в сухих экстрактах (в пересчете на феофитин). 1 мл раствора А вносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем до метки спиртом. Снимали УФ-спектр в диапазоне от 350 до 700 нм на спектрофотометре СФ-2000. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны максимума в области 665±5 нм. В качестве раствора сравнения использовали спирт. Содержание суммы хлорофиллов в пересчете на феофитин и сухой экстракт в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot 755 \cdot (100 - w)} = \frac{D \cdot 5000}{m \cdot 755 \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески экстракта, г; w – потеря в массе при высушивании испытуемого экстракта, %; 755 – коэффициент удельной экстинкции при длине волны максимума в области 665±5 нм (равен оптической плотности раствора феофитина А при концентрации 1% и толщине кюветы 1 см).

Определение доли сухого остатка в суммарной вытяжке травы эхинацеи после проведения трехступенчатой мацерации

В предварительно взвешенные 2 бюкса наливали по 10–15 мл раствора (точная навеска). Помещали в сушильный шкаф при 90 °С. Сушили до постоянной массы. Взвешивали после сушки и рассчитывали сухой остаток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстрагирование осуществляли в режиме вакуумного кипения.

Для исследования процесса экстракции в режиме вакуумного кипения была собрана установка, представленная на рисунке 6.

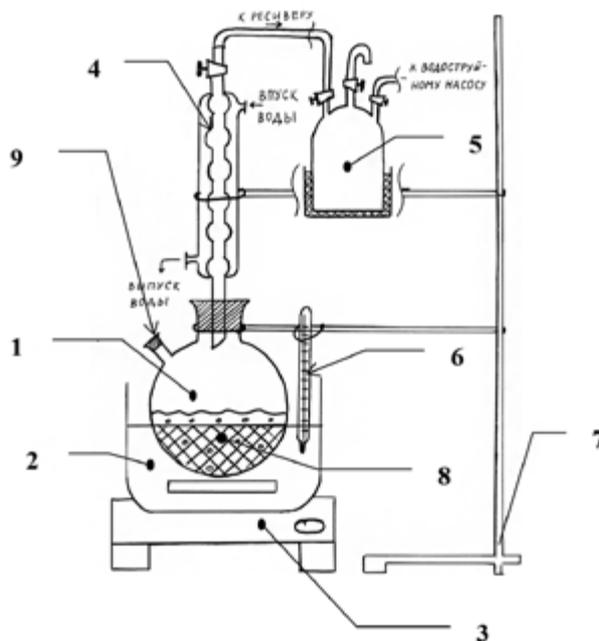


Рисунок 6. Установка для экстрагирования в режиме вакуумного кипения: 1 – колба-экстрактор; 2 – водяная баня; 3 – электроплитка; 4 – обратный холодильник; 5 – ресивер; 6 – термометр; 7 – штатив; 8 – экстрагируемое растительное сырье и экстрагент; 9 – тубус для отбора проб

Экстрактор представляет собой круглодонную колбу (1) вместимостью 1 л с тубусом для отбора проб (9). В качестве нагревателя использовали водяную баню (2) на плитке (3), температуру измеряли термометром (6). Вакуум создавали с помощью мембранного или водоструйного насоса, к которому через ресивер (5) подключен обратный холодильник (4).

Проводили экстракцию методом трехступенчатой мацерации с возрастанием полярности экстрагента (70, 40 и 15–20% этиловый спирт). Такая последовательность экстрагентов была выбрана для возможности извлечения как липофильной, так и гидрофильной фракций БАВ.

Таблица 1.

Загрузки, параметры и выходы полупродуктов в процессе экстракции эхинацеи в режиме вакуумного кипения

1 мацерация		
Загружено, г	Номер партии (варианта)	
	1.01	2.01
Экстрагент и модуль экстракции	70% спирт; 5:1 по массе	70% спирт; 5:1 по массе
Эхинацеи трава сухая	100	200
Этиловый спирт 95%	368	736
Вода	132	264
Итого	600	1200
Получено, г		
Вытяжка 1	210	527
Шрот влажный, в его составе	314	619
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	150	293
Вода	64	126
Потери	76	54
Итого	600	1200
2 мацерация		
Загружено, г		
Экстрагент и модуль экстракции	40% спирт; 6:1 по массе	40% спирт; 6:1 по массе
Шрот влажный, в его составе	314	619
Шрот сухой	100	200
Спирт	150	293
Вода	64	126
Этиловый спирт 95%	95	197
Вода	291	584
Итого	700	1400
Получено, г		
Вытяжка 2	298	583
Шрот влажный, в его составе	394	768
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	118	227
Вода	176	341
Потери	8	49
Итого	700	1400
3 мацерация		
Загружено, г		
Экстрагент и модуль экстракции	20% спирт; 6:1 по массе	16,2% спирт; 7:1 по массе
Шрот влажный, г; в его составе	394	768
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	118	227
Вода	176	341
Вода	306	832
Итого	700	1600
Получено, г		
Вытяжка 3	220	830
Шрот влажный	410	720
Потери	70	50
Итого	700	1600
Объединение трех полученных извлечений		
Получено объединенного жидкого извлечения, г	700	1940

Методика проведения работы: собирали установку для вакуумного кипения, предварительно взвесив пустую колбу-экстрактор (1).

Проводили последовательно 3 мацерации со смесью экстрагента (таблица 1).

Первая мацерация: в колбу загружали 100 г сухого сырья травы эхинацеи, 500 г этилового спирта 70% (в соответствии с модулем экстракции 1:5 по массе), помещали на водяную баню. Нагревали баню до 60 °С и включали вакуум. Доводили вакуум до активного кипения в колбе, что обеспечивало эффективное перемешивание и обработку массы сырья парожидкостной смесью экстрагента при пониженной температуре (50–60 °С); в этих условиях достигается наиболее полное извлечение экстрактивных веществ, а также сохранность структуры и свойств извлекаемых БАВ.

Через 30 мин впускали воздух в систему и делали через тубус колбы первый отбор пробы (2 мл). Закрывали пробку и снова подавали вакуум. Температура в бане поддерживалась на уровне 50–60 °С, в колбе – бурное кипение. Таким образом, благодаря периодическому включению вакуума создавался режим вакуумной пульсации, позволяющий экстрагенту проникать в поры растительного сырья и лучше извлекать БАВ. При таком режиме не происходит измельчения сырья в процессе экстрагирования. Делали пять отборов для анализа (через 30, 60, 90, 120 и 150 мин от начала кипения). После окончания первой мацерации (спустя 150 мин от начала кипения) экстракт 1 сливали через сито капроновое № 69 в предварительно взвешенный флакон. Взвешивали и регистрировали массу и объем экстракта 1 и шрота влажного по разности массы колбы со шротом и пустой.

Вторая мацерация: рассчитывали необходимое количество добавляемого этилового спирта и воды для получения 40% экстрагента в соответствии с заданным модулем экстракции. Приливали через тубус рассчитанные количества спирта и воды. Включали нагрев, периодически включали вакуум. Дальнейшие операции с отборами проб выполняли, как в первой мацерации.

Третья мацерация: на основании массы влажного шрота и модуля экстракции к шроту прибавляли только рассчитанное количество воды (без спирта). Рассчитывали содержание спирта в третьем экстрагенте. Проводили процесс аналогично предыдущим с отборами проб.

Объединяли все три вытяжки, хранили в герметичном контейнере.

Доля сухого остатка суммарного извлечения составила в среднем $2,40 \pm 0,59\%$.

Кинетика процесса экстрагирования в режиме вакуумного кипения

Представляло интерес изучение характера извлечения гидрофильных и липофильных фракций в процессе трех экстракций с переменным составом экстрагента.

Для изучения кинетики использовали отборы извлечений, взятые в ходе проведения экстракции (таблица 1).

Результаты определения ЦК и СХ в пробах извлечений при изучении кинетики в режиме вакуумного кипения приведены на рисунках 7 и 8.

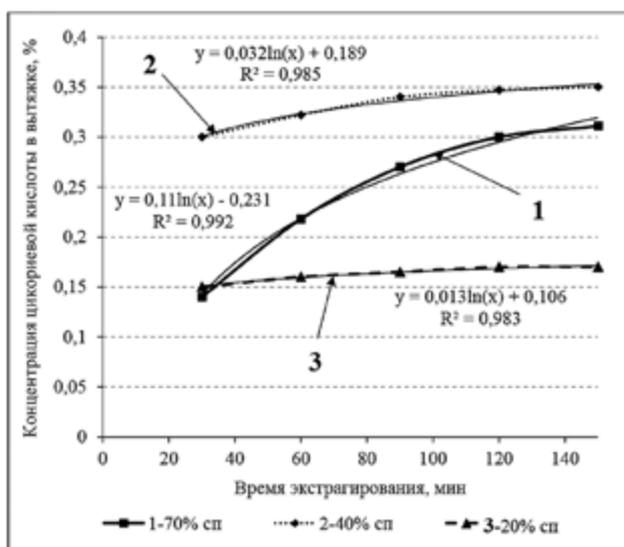


Рисунок 7. Кинетика извлечения цикориевой кислоты и эхинакозида при трех мацерациях в режиме вакуумного кипения

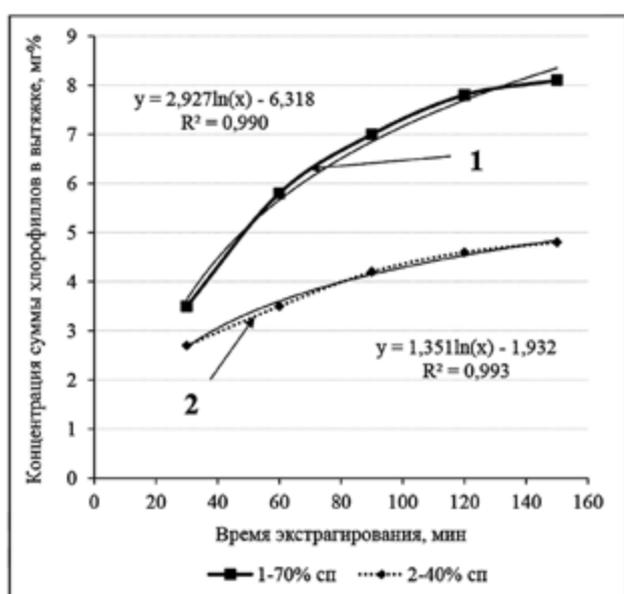


Рисунок 8. Кинетика извлечения суммы хлорофиллов при двух мацерациях в режиме вакуумного кипения

Как видно из полученных результатов, концентрация цикориевой кислоты и эхинакозида при экстрагировании 70% спиртом возрастает в течение 2,5 часов по логарифмическому закону (рисунок 7, кривая 1). При замене экстрагента на 40% спирт извлечение этой группы веществ происходит наиболее эффективно; при этом сказывается обработка шрота предыдущим экстрагентом (рисунок 7, кривая 2). Дальнейшее увеличение воды в экстрагенте (20% спирт) приводит к меньшим концентрациям экстрактивных веществ в извлечении, что связано также с постепенным истощением сырья (рисунок 7, кривая 3).

Липофильная сумма производных хлорофилла преимущественно извлекается 70% спиртом и значительно меньшая часть – 40% спиртом (рисунок 8). В 20% спирте СХ и близкие к ним по полярности вещества практически не обнаруживаются.

Установлено, что скорость извлечения цикориевой кислоты выше на первой мацерации, когда 70% этиловый спирт подается на свежее сырье (траву эхинацеи сухую) и вытяжка наиболее обогащена БАВ, в том числе цикориевой кислотой. Однако степень извлечения больше на второй мацерации 40% этиловым спиртом, в котором цикориевая кислота лучше растворима. Остаточное количество цикориевой кислоты извлекается ~20% спиртом на третьей мацерации.

Скорость и степень извлечения липофильной фракции максимальны на первой мацерации с 70% спиртом. На второй мацерации 40% спиртом хлорофиллы извлекаются незначительно, их обнаружение связано в основном с разбавлением влажного шрота следующей порцией экстрагента после 1-й мацерации.

Таким образом, способ последовательной экстракции рядом экстрагентов с возрастающей полярностью дает на первой мацерации максимальный выход по хлорофиллам, на второй – по фенолпропаноидам (цикориевой кислоте); третья мацерация позволяет извлечь, кроме цикориевой кислоты, значительную часть полисахаридов. При 4-й мацерации истощенно шрота водой извлекается остаток полисахаридов.

Поскольку практической целью исследования являлось получение сухого полиэкстракта, обогащенного как липофильными, так и гидрофильными БАВ эхинацеи, жидкие извлечения из трех мацераций перед последующей сушкой объединяли (таблица 1).

Для получения сухого полиэкстракта эхинацеи проводили упаривание и сушку объединенного жидкого извлечения эхинацеи.

Взвешенное объединенное извлечение помещали в колбу вакуум-роторного испарителя для удаления основной массы растворителя. Упаривание вели под вакуумом при температуре 50–60 °С до того момента, как вытяжка становилась густой. Отгон собирали в отдельную колбу и направляли на регенерацию спирта.

Сгущенную вытяжку сушили в сушильном шкафу при температуре 70 °С до очень вязкого, слаботекучего состояния.

Остаток досушивали в вакуум-сушильном шкафу или вакуум-эксикаторе до постоянной массы. Затем измельчали и просеивали сухой полиэкстракт.

Полученный сухой полиэкстракт эхинацеи представляет собой порошок зелено-бурого цвета, гигроскопичный, плохо сыпучий, с характерным запахом. Качественный состав суммарного сухого полиэкстракта показан на рисунке 9.

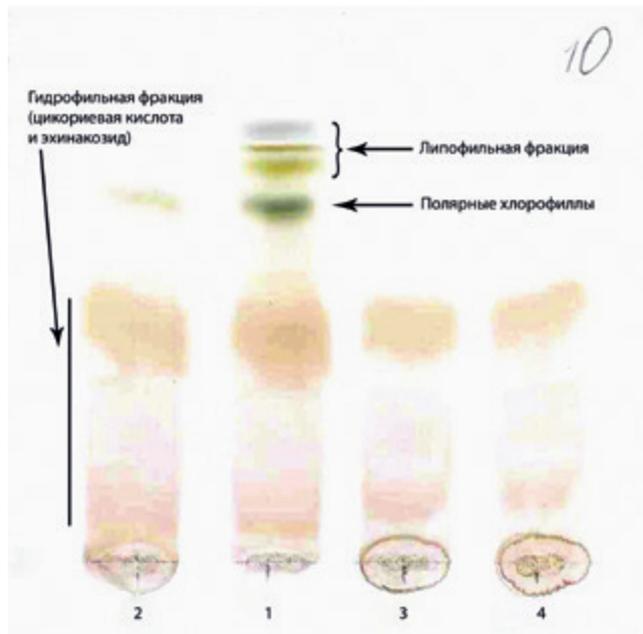


Рисунок 9. Тонкослойная хроматография четырех извлечений, полученных методом последовательной экстракции травы эхинацеи рядом экстрагентов с возрастающей полярностью. Хроматограмма в системе гексан : ацетон (7:3), дополнительно проявленная в системе бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:1), обнаружение в парах аммиака.

1 – первое извлечение 70% спиртом; 2 – второе извлечение 40% спиртом; 3 – третье извлечение 15–17% спиртом; 4 – четвертое, остаточное, извлечение 5–10% спиртом

Сравнительная характеристика сухих экстрактов эхинацеи, полученных различными способами

В России зарегистрированы и выпускаются 2 вида сухих экстрактов эхинацеи (далее СЭЭ), предназначенные для производства готовых лекарственных форм экстракцией водой (СЭЭ-в) [12] и экстракцией 24% этиловым спиртом (СЭЭ-в/с) [8].

Представляло интерес сравнение составов и некоторых свойств разрабатываемого нами полиэкстракта с выпускаемыми экстрактами.

Качественную сравнительную характеристику проводили путем анализа сухих экстрактов методом ТСХ. Хроматограммы представлены на рисунках 10 и 11.

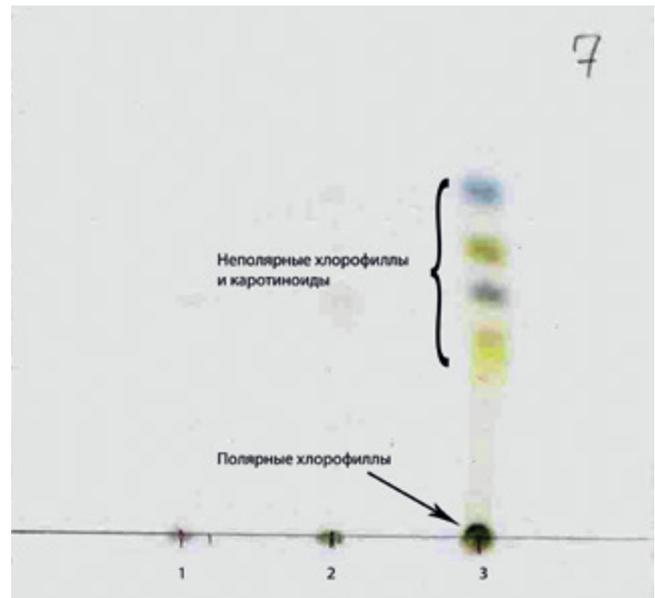


Рисунок 10. Хроматограмма, полученная в системе гексан : ацетон (7:3) с нанесенными на нее образцами трех СЭЭ с нагрузкой 50 мкл

1 – СЭЭ-в – экстракция горячей водой; 2 – СЭЭ-в/с – экстракция 24% этиловым спиртом; 3 – СПЭ – экстракция с возрастанием полярности экстрагента

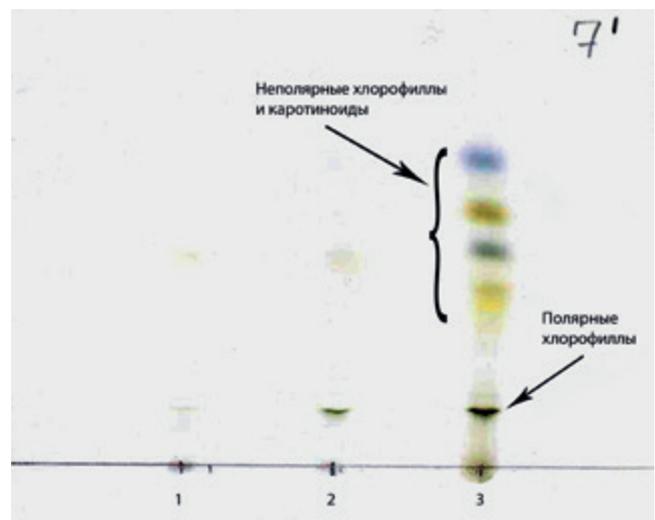


Рисунок 11. Хроматограмма, полученная в системе гексан : ацетон (7:3) и дополнительно помещенная в систему хлороформ : уксусная кислота (4:0,5:0,1) для сдвига стартовых (полярных) хлорофиллов. Обозначения те же, что на рисунке 10

Сухой полиэкстракт эхинацеи (образец 3, рисунки 10 и 11) содержит более широкий спектр липофильных веществ, причем в этой области могут находиться и минорные липофильные вещества, укладываемые по величине R_f между полярными и неполярными хлорофиллами и каротиноидами.

Липофильная фракция сухого экстракта эхинацеи, полученного экстракцией 24% этанолом, содержит незначительное количество только полярных произ-

водных хлорофилла (1 пятно), что позволяет предположить отсутствие фармакологических свойств, обусловленных липофильными БАВ эхинацеи. Сухой экстракт эхинацеи, полученный экстракцией водой, совсем не содержит хлорофиллов, то есть липофильной фракции БАВ.

Для анализа и частичной идентификации липофильной фракции СПЭ проведена микропрепаративная ТСХ с разделяющей системой гексан : ацетон (7:3) (рисунок 12) и последующим элюированием и спектроскопией элюатов (рисунок 13).

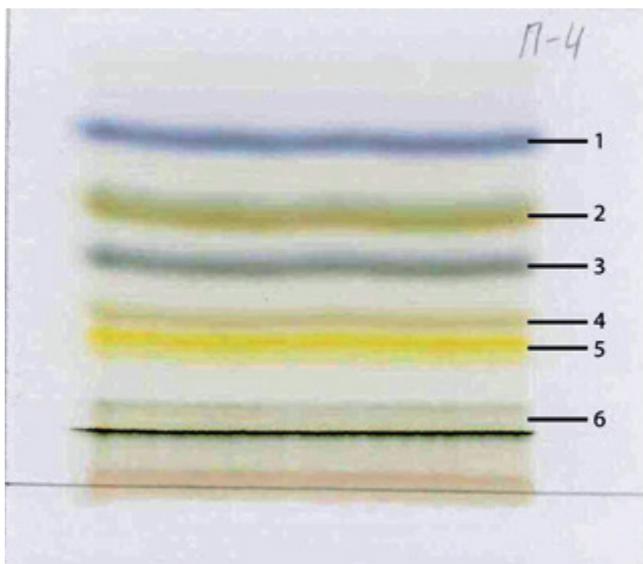


Рисунок 12. Микропрепаративная хроматограмма с разделившейся липофильной фракцией (6 полос) полиэкстракта эхинацеи для элюирования

Полученные спектры сопоставили с данными литературы. Установлено наличие неполярных и полярных производных хлорофиллов (пятна № 1, 2, 3, 6), а также каротиноидов (№ 5). Спектр, снятый с пятна № 4, не идентифицирован, вероятно, содержит следы хлорофиллов.

Проведен также качественный анализ группы полярных БАВ эхинацеи – фенилпропаноидов – в трех сухих экстрактах, полученных различными способами (рисунок 14).

Гидрофильная фракция всех сравниваемых СЭЭ содержит два пятна производных оксикоричных кислот, по-видимому, цикориевой кислоты и эхинакозида, видимых при проявлении аммиаком и серной кислотой. Сумма этих производных в пересчете на цикориевую кислоту в трех экстрактах примерно одинакова и составляет 7,2-7,6% от сухого экстракта.

При обнаружении серной кислотой на старте наблюдаются темные пятна полисахаридов, которых больше всего в СЭЭ, полученном экстракцией водой.

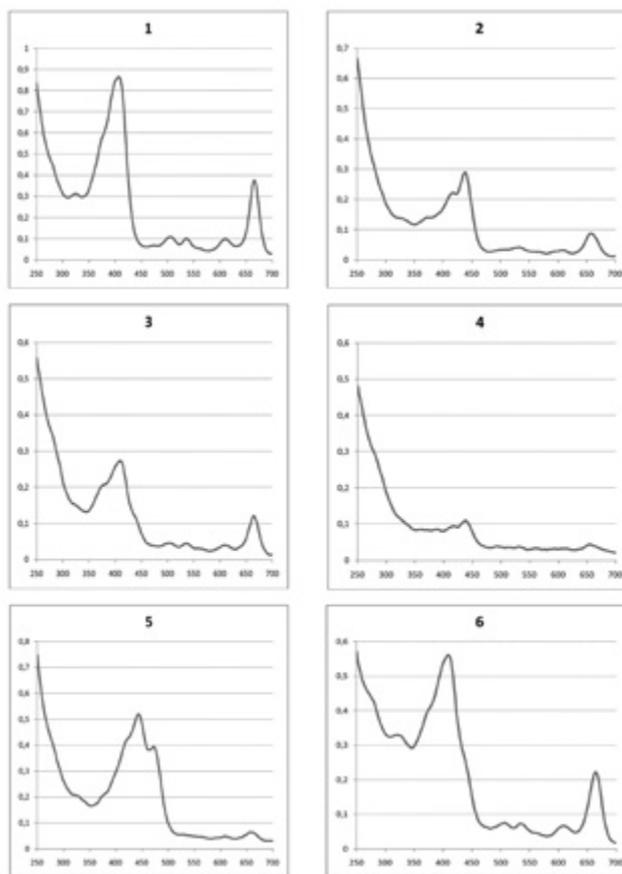


Рисунок 13. Электронные спектры элюатов полос на микропрепаративной хроматограмме (рисунок 12)

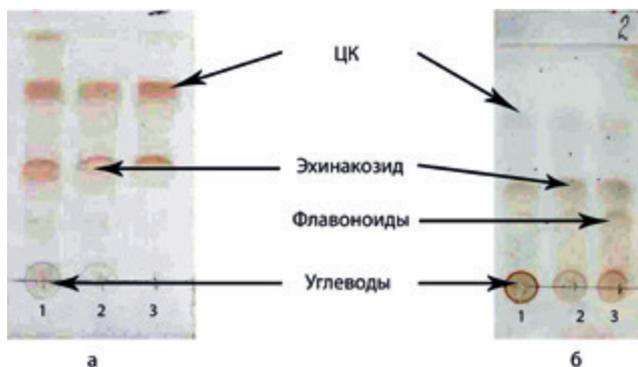


Рисунок 14. ТСХ образцов трех СЭЭ в системе н-бутанол : уксусная кислота : вода 4:1:1 (БУВ), нагрузка – по 5 мкл. Обнаружение в парах аммиака (а) и серной кислотой (б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракция травы эхинацеи, проведенная методом трехступенчатой мацерации в режиме вакуумного кипения с возрастанием полярности экстрагента (70, 40 и 15–20% спирт), позволила получить полиэкстракт, содержащий гидрофильные и липофильные вещества, близкий по составу к нативному комплексу БАВ эхинацеи.

Конечный продукт – сухой полиэкстракт эхинацеи – отличается от выпускаемых промышленных аналогов наличием широкого спектра липофильных веществ, из которых частично идентифицированы полярные и неполярные производные хлорофиллов, а также каротиноиды.

Гидрофильная фракция трех сравниваемых экстрактов содержит по два характерных пятна производных оксикоричных кислот, вероятно, цикориевой кислоты и эхинакозида. Сумма этих производных в пересчете на цикориевую кислоту в трех экстрактах примерно одинакова и составляет 7,2–7,6% от сухого экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Е. В. Лекарственные растения, содержащие фенолпропаноиды, как источник получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов. Автореферат. докт. дисс., Пятигорск, 2007. 276 с. [Avdeeva E. V. Lekarstvennye rastenija, soderzhashhie fenilpropanoidy, kak istochnik poluchenija gepatoprotekturnyh i immunomodulirujushhih preparatov. Avtoreferat dokt. diss. [Medicinal plants containing phenylpropanoids as a source of hepatoprotective and immunomodulating drugs. Abstract of the doctoral dissertation.] Pyatigorsk, 2007. 276 p.]
2. Бакуридзе А. Д., Курцикидзе М. Ш., Писарев В. М., Махарадзе Р. В., Берашвили Д. Т. Иммуномодуляторы растительного происхождения (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1993. № 8. С. 43–46. [Bakuridze A. D., Kurcikidze M. Sh., Pisarev V. M., Maharadze R. V., Berashvili D. T. Immunomodulatory rastitel'nogo proishozhdenija (obzor) // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. [Immunomodulators of plant origin (review) // Chemical-Pharmaceutical journal.] 1993. № 8. P. 43–46.]
3. Бизунок Н. А. Эхинацея: ботаника, история, химия, фармакология // Медицинские новости. 2006. № 4. С. 19–26. [Bizunok N. A. Jehinaceja: botanika, istorija, himija, farmakologija // Medicinskie novosti. [Echinacea: botany, history, chemistry, pharmacology // Medical News.] 2006. № 4. P. 19–26.]
4. Вайнштейн, В. А., Каухова. И. Е. Двухфазная экстракция в получении лекарственных и косметических средств. СПб, 2010. 104 с. [Vajnshtejn, V. A., Kauhova. I. E. Dvuhfaznajekstrakcijavpolucheniiilekarstvennyhikosmeticheskisredstv. [Two-phase extraction in obtaining medicinal and cosmetic means.] St. Petersburg, 2010. 104 p.]
5. Вальчихина О. Ю., Демина Н. Б., Надер А. Корневище имбиря как перспективное растительное сырье для создания лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4. С. 62–70. [Val'chihina O. Ju., Demina N. B., Nader A. Kornevishhe imbirja kak per-spektivnoe rastitel'noe syr'e dlja sozdaniija lekarstvennyh sredstv // Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv [The ginger rhizome as a promising plant raw material for the creation of medicines // Drug development and registration.] 2015. № 4. P. 62–70.]
6. Косман В. М., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Изучение состава биологически активных веществ сухих экстрактов эхинацеи узколистной и шалфея лекарственного // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С.153–160. [Kosman V. M., Pozharickaja O. N., Shikov A. N., Makarov V. G. Izuchenie sostava biologicheskij aktivnyh veshhestv suhih jekstraktov jehinacei uzkolistnoj i shalfeja lekarstvennogo // Himija rastitel'nogo syr'ja [Study of the composition of biologically active substances of dry extracts of echinacea narrow-leaved and sage medicinal // Chemistry of plant raw material.] 2012. № 1. P. 153–160.]
7. Минина, С. А., Каухова И. Е. Химия и технология фитопрепаратов. М, 2009. 560 с. [Minina, S. A., Kauhova I. E. Himija i tehnologija fitopreparatov [Chemistry and technology of phytopreparations.] М, 2009. 560 p.]
8. Патент RU 2137490. Иммуностимулирующее средство эстифан и способ его получения / Качалина Т. В., Колхир В. К., Охоникова В. Ф., Сакович Г. С., Сенина Т. А., Сидорова Е. А., Стихин В. А.; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений «ВИЛАР» РАСХН. – Заявл. 26.03.98; опубл. 20.09.99. [Patent RU 2137490. Immunostimulirujushhee sredstvo jestifan i sposob ego poluchenija [Patent RU 2137490. Immunostimulating means estifan and its obtaining method] / Kachalina T. V., Kolhir V. K., Ohonikova V. F., Sakovich G. S., Senina T. A., Sidorova E. A., Stihin V. A.; patentoobladatel' Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut lekarstvennyh i aromaticeskijh rastenij «VILAR» RASHN. – Zjavl. 26.03.98; opubl. 20.09.99.]
9. Самородов В. Н., Поспелов С. В., Моисеева Г. Ф., Серeda А. В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (Echinacea Moench.) и его фармакологические свойства (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1996. № 4. С. 32–37. [Samorodov V. N., Pospelov S. V., Moiseeva G. F., Sereda A. V. Fitohimicheskij sostav predstavitelej roda jehinaceja (Echinacea Moench.) i ego farmakologicheskie svojstva (obzor) // Himiko-farmaceuticheskijzhurnal. [Phytochemical composition of representatives of the genus Echinacea (Echinacea Moench.) and its pharmacological properties (review) // Chemical-Pharmaceutical journal.] 1996. № 4. P. 32–37.]
10. Серeda А. В., Моисеева Г. Ф. Биологически активные вещества и стандартизация лекарственных растений рода Echinacea // Фармаком. 1998. № 3. С. 13–23. [Sereda A. V., Moiseeva G. F. Biologicheskij aktivnye veshhestva i standartizacija lekarstvennyh rastenij roda Echinacea // Farmakom. [Biologically active substances and standardization of medicinal plants of the genus Echinacea // Pharmacom.] 1998. № 3. P. 13–23.]
11. Справочник лекарств РЛС. [Spravochnik lekarstv RLS. [Reference book of medicines RLS]. Availableat: <https://www.rlsnet.ru/> (accessed 14.01.18).
12. Эхинацеи экстракт сухой (Echinacea extract siccum). Инструкция по применению. [Jehinacei jekstrakt suhoj (Echinacea extract siccum). Instrukcija po primeneniju. [Echinacea dry extract (Echinacea extract siccum). Instructions for use]. Available at: <http://www.rusmedserv.com/lekarstva/ehinatsei-ekstrakt-suhoy.html> (accessed 14.01.18).

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ЧЕРЕДЫ ТРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ ТРАВЫ, ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ТРАВЫ, РЕПЕШКА ОБЫКНОВЕННОГО ТРАВЫ

И. Е. Каухова^{1*}, Е. К. Новикова¹, Д. А. Чачин¹

Резюме. Целью исследования является разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы в технологии сухих экстрактов. Изучено влияние факторов на процесс экстрагирования действующих веществ череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. Изучены особенности и установлены закономерности экстрагирования золотарника канадского травы, череды трехраздельной травы, репешка обыкновенного травы.

Ключевые слова: череды трехраздельной трава, золотарника канадского трава, репешка обыкновенного трава, режимы экстрагирования, сухие экстракты.

THE DEVELOPMENT CONDITIONS FOR EXTRACTION OF THE *BIDENS TRIPARTITA* L., *SOLIDAGO CANADENSIS* L. AND *AGRIMONIA EUPATORIA* L. HERBS

I. E. Kaukhova^{1*}, E. K. Novikova¹, D. A. Chachin¹

Abstract. The aim of the study on the development conditions for extraction of a series of three-part herbs, *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. herbs in the technology of dry extracts. The influence of factors on the process of extraction of activity substances of a series of three-part herbs, *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. have been studied. Features are studied and regularities of extraction of *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. herbs.

Keywords: *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L., extraction modes, dry extract.

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

¹ – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare, 14/A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: irina.kaukhova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Болезни почек являются наиболее сложными с клинической точки зрения. В связи с этим разработка новых препаратов для лечения заболеваний почек и увеличение ассортимента нефропротекторных средств на фармацевтическом рынке представляются особенно актуальными. Фитотерапия, как метод безопасного базисного лечения многих заболеваний с помощью гармонизации естественных процессов детоксикации, направлена на улучшение функционального состояния почек и может существенно повысить как эффективность, так и безопасность базисной фармакотерапии [1, 2].

Первым этапом разработки новых фитопрепаратов для лечения и профилактики поражений почек явился выбор лекарственного растительного сырья. В качестве сырья были взяты следующие официальные лекарственные растения: трава череды трёхраздельной (содержит флавоноиды, обладает выраженными иммуномодулирующими и диуретическими свойствами,

а также противоаллергическим действием); трава золотарника канадского (содержит тритерпеновые сапонины, входит в состав различных урологических препаратов); трава репешка обыкновенного (содержит дубильные вещества, обладает гастро- и гепатопротекторными свойствами, улучшает работу органов пищеварения) [4–6]. Подобная комбинация ранее нигде не описывалась, а для лечения заболевания почек использовались лишь по отдельности череда трёхраздельная и золотарник канадский. В то же время с фармакологической точки зрения усматривается отчётливое синергическое действие [8, 9].

Одной из основных задач в технологии фитосубстанций, в частности сухих экстрактов, является подбор оптимальных условий, режимов экстрагирования для получения извлечений, которые будут максимально обогащены биологически активными веществами. Исследовано влияние различных технологических факторов, которые могут оказать существенное влияние на выход экстрактивных веществ, таких как:

- метод экстрагирования;
- подбор экстрагента и его концентрации;
- соотношение используемого сырья и выбранного экстрагента (модуль экстракции).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для настоящего исследования использовали череду трехраздельной траву, золотарника канадского траву, репешка обыкновенного траву, заготовленные в 2014–2015 гг. на базе питомника ФГБОУ ВО СПХФА (пос. Лемболово, Ленинградской обл.) и высушенные при температуре 50–60 °С до остаточной влажности 12±1%. Для заготовленных партий сырья установлено, что сырье соответствует требованиям Государственной фармакопеи (ГФ) 13 издания [3, 7].

Экстракцию сырья проводили следующим образом: навеску растительного сырья, измельченного до размера частиц 1,0–1,5 мм, загружали в экстрактор, заливали экстрагентом. Экстрагент, время экстракции, соотношение сырья и экстрагента (модуль) варьировались. Для извлечения действующих веществ из сырья методом мацерации экстракцию проводили на кипящей водяной бане в течение 2 ч (120 мин) при температуре 100 °С с использованием обратного холодильника. Ультразвуковую экстракцию проводили с использованием ультразвуковой ванны ПСБ-1335-05 (Россия) с рабочей частотой 35 кГц. Затем полученное спиртоводное извлечение отфильтровывали, упаривали в роторно-пленочном испарителе [DAIHAN Scientific Co., Ltd. (Witeg Labortechnik GmbH)] до густого кубового остатка и сушили в сушильном шкафу ШС-80-01 (Россия) при 55–60 °С до получения сухого экстракта. Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с требованиями ГФ 13 изд. [3]. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ 13 изд. [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор экстрагента и модуля экстракции при проведении мацерации

Одним из основных критериев наиболее полного извлечения из лекарственного растительного сырья целевых биологически активных веществ является подбор оптимального экстрагента.

В качестве экстрагента использовались спиртоводные растворы различной концентрации, позволяющие извлекать соединения различной полярности, с последующим выбором одного из них.

Для экстрагирования череды трехраздельной травы, содержащей в качестве основных БАВ флавоноиды, использовался спирт этиловый в концентрации 40% и 70%. Также параллельно определяли влияние модуля экстракции на выход экстрактивных веществ. Полученные результаты представлены на рисунке 1.



Рисунок 1. Влияние природы экстрагента и модуля экстракции на выход веществ из череды трехраздельной травы

На основании анализа полученных данных установлено, что наибольший выход суммы экстрактивных веществ из травы череды трёхраздельной наблюдается при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70%-го и при соотношении исходного сырья и экстрагента 1:20.

Для установления полноты извлечения суммы экстрактивных веществ из травы золотарника канадского был использован спирт этиловый с концентрациями 40%, 50% и 70%.

Для определения влияния модуля экстракции на выход экстрактивных веществ были взяты соотношения сырья и экстрагента 1:10 и 1:20. На основании анализа полученных данных, представленных на рисунке 2, установлено, что наибольший выход суммы экстрактивных веществ из травы золотарника канадского достигался при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 40%-го и при соотношении исходного сырья и экстрагента 1:20.



Рисунок 2. Влияние природы экстрагента и модуля экстракции на выход веществ из золотарника канадского травы

Для установления полноты извлечения суммы экстрактивных веществ из репешка обыкновенного травы был использованы спиртоводные растворы в концентрации 40% и 70%.

Для определения влияния модуля экстракции на конечный выход экстрактивных веществ были взяты соотношения сырья и экстрагента 1:10 и 1:20. На осно-

вании анализа полученных данных установлено, что наибольший выход суммы экстрактивных веществ из травы репешка обыкновенного происходит при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 40%-го и при соотношении сырья и экстрагента 1:20 (рисунок 3).



Рисунок 3. Влияние природы экстрагента и модуля экстракции на выход веществ из репешка обыкновенного травы

Установленные условия экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Условия экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы

Исходное сырьё	Экстрагент	Модуль экстракции	Метод экстрагирования	Время экстрагирования
Черёда трёхраздельная	Спирт этиловый 70%	1:20	Мацерация на кипящей водяной бане с использованием обратного холодильника	120 мин
Золотарник канадский	Спирт этиловый 40%	1:20		120 мин
Репешок обыкновенный	Спирт этиловый 40%	1:20		120 мин

Методы интенсификации процесса экстрагирования

Для интенсификации процесса экстрагирования растительного сырья был использован ультразвук и проведена сравнительная экстракция экстрактивных веществ из череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы и репешка обыкновенного травы. Известно, что применение ультразвука для экстрагирования растительного сырья в ряде случаев значительно ускоряет процесс и обеспечивает более полное извлечение действующих веществ из сырья [10].

Процесс экстрагирования проводили при использовании тех же экстрагентов и модулей экстракции, которые были установлены ранее опытным путём. Время воздействия ультразвука было выбрано в диапазоне от 20 до 25 мин на основании предварительно проведенных исследований. Температурный режим был выдержан в пределах от 40 до 50 °С, так как данная температура полностью исключает возможность разложения термолабильных веществ, а также ускоряет процесс извлечения биологически активных веществ. Из извлечений были получены сухие экстракты по типовой схеме [7]. Результаты представлены на рисунке 4.



Рисунок 4. Сравнительная характеристика методов экстракции в технологии сухих экстрактов

При анализе полученных данных о проведении ультразвуковой экстракции можно сделать вывод о том, что выход экстрактивных веществ при использовании ультразвука значительно выше, чем при использовании мацерации на кипящей водяной бане. При этом увеличение выхода суммы экстрактивных веществ варьировалось от 13,8% (для череды трёхраздельной травы) до 16,5% (для репешка обыкновенного травы).

Подобранные параметры процесса экстрагирования при помощи ультразвука и сравнительная характеристика методов экстракции представлены в таблицах 2 и 3 соответственно:

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено влияние различных параметров на извлечение суммы экстрактивных веществ, а также разработаны условия экстрагирования череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы и репешка обыкновенного травы.

Исследованы особенности и установлены закономерности экстрагирования золотарника канадского травы, череды трёхраздельной травы, репешка обыкновенного травы. Установлено, что спиртоводный экстрагент в концентрации 40% извлекает большее количество экстрактивных веществ из золотарника ка-

надского и репешка обыкновенного, а спиртоводный экстрагент в концентрации 70% – из череды трехраздельной. При этом модуль экстракции для всех видов сырья составляет 1:20.

Таблица 2.

Параметры процесса экстракции травы череды трёхраздельной, травы золотарника канадского и травы репешка обыкновенного с использованием ультразвука

Исходное сырьё	Экстрагент	Модуль экстракции	Время экстрагирования, мин	Температура экстрагирования, °С
Череда трёхраздельная	Спирт этиловый 70%	1:20	25	40...50
Золотарник канадский	Спирт этиловый 40%	1:20	20	40...50
Репешок обыкновенный	Спирт этиловый 40%	1:20	25	40...50

Таблица 3.

Влияние метода экстракции на выход БАВ травы череды трёхраздельной, травы золотарника канадского и травы репешка обыкновенного

Исходное сырьё	Выход экстрактивных веществ при мацерации на кипящей водной бане, %	Выход экстрактивных веществ при использовании ультразвука, %	Увеличение выхода экстрактивных веществ, %
Череда трёхраздельная	19,50 ± 0,25	33,30 ± 0,85	13,80
Золотарник канадский	27,50 ± 0,74	43,80 ± 0,57	16,30
Репешок обыкновенный	17,50 ± 0,65	34,00 ± 0,74	16,50

Установлено, что применение ультразвуковой экстракции в технологии сухих экстрактов череды трёхраздельной травы, золотарника канадского травы и репешка обыкновенного травы повышает выход экстрактивных веществ на 13,8–16,5% по сравнению с методом мацерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аполихин О. И., Сиков А. В., Мосчкалева Н. Г., Солнцева Т. В., Комарова В. А. Анализ уронефрологической заболеваемости и смертности в Российской Федерации за десятилетний период (2302–2012 гг.) по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. № 2. С. 4–13. [Apolihin O. I., Sikov A. V., Moschkaleva N. G., Solnceva T. V., Komarova V. A. Analiz uronefrologicheskoj zabol'evaemosti i smertnosti v Rossijskoj Federacii za desjatiletnij period (2302–2012 gg.) po dannym oficial'noj statistiki // Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija. [The analysis of uronephrosiological morbidity and mortality in the Russian Federation for a 10-year period (2302–2012) according to official statistics // Experimental and clinical urology.] 2014. № 2. P. 4–13.]
2. Гоженко А. И. Патогенез токсических нефропатий // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2006. № 2(4). С. 9–13. [Gozhenko A. I. Patogenez toksicheskih nefropatij // Aktual'nye problem transportnoj mediciny. [Pathogenesis of toxic nephropathies // Actual problems of transport medicine.] 2006. № 2(4). P. 9–13.]
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. / МЗРФ. М., 2015. 1470 с. [Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izd. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed.] T. 1. / MZ RF. M., 2015. 1470 p.]
4. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Agrimonia eupatoria* L. – Репешок обыкновенный, или лекарственный // Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). – М. 2004. – С.356. [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Agrimonia eupatoria* L. – Repeshok obyknovennyj, ili lekarstvennyj // Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. T. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Agrimonia eupatoria L. – Common caddis, or medicinal // Illustrated determinant of plants in Central Russia. V. 2. Angiosperms (dicotyledonous: dendritic-lobed).] – M. 2004. P. 356.]
5. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Bidens tripartite* L. – Череда трехраздельная // Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). М. 2004. С. 353 [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Bidens tripartite* L. Chereda trehrazdel'naja // Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. T. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Bidens tripartite L. – Three-parted sequence // Illustrated determinant of plants in Central Russia. T. 2. Angiosperms (dicotyledonous: dendritic-lobed).] M. 2004. P. 353.]
6. Губанов И. А., Киселева К. В., Новиков В. С., Тихомиров В. Н. *Solidago Canadensis* L. – Золотарник канадский // Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т. 2. Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестковые). М. 2004. С. 487. [Gubanov I. A., Kiselev K. V., Novikov V. S., Tihomirov V. N. *Solidago Canadensis* L. – Zolotarnik kanadskij // Illjustrirovannyj opredelitel' rastenij Srednej Rossii. V. 2. Pokrytosemennye (dvudol'nye: razdel'nolepestkovyje). [Solidago Canadensis L. – Golden Canal // Illustrated determinant of plants in Central Russia. T. 2. Angiosperms (dicotyledonous: dendritic-lobed).] M. 2004. P. 487.]
7. Novikova E. K., Kaukhova I. E. Production and standardization of extracts from *Bidens tripartite*, *Solidago Canadensis* and *Agrimonia eupatoria* // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. С. 27.
8. Новикова Е. К., Чачин Д. А. Обоснование состава фитопрепарата, обладающего гипозотемическими свойствами // Сборник материалов VI Всероссийской научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего». – СПб. 2016. С. 480. [Novikova E. K., Chachin D. A. Obosnovanie sostava fitopreparata, obladajushhego gipozotemicheskimi svojstvami // Sbornik materialov VI Vserossijskoj nauchnoj konferencii «Molodaja farmacija – potencial budushhego». [Justification of the phytopreparation composition having hypo-isotemic properties // Collection of materials of the VI All-Russian scientific conference "Young pharmacy is the potential of the future".] – SPb. 2016. P. 480.]
9. Сивак К. В., Лесиовская Е. Е., Ожигова М. Г., Хаким Эль Мабруки, Новикова Е. К. Нефропротекторная и антифибротическая активность композиции экстрактов из надземных частей *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae), *Bidens tripartita* и *Solidago canadensis* (Asteraceae) при токсических нефропатиях // Растительные ресурсы. 2017. № 53(2). С. 265–283. [Sivak K. V., Lesiovsckaja E. E., Ozhigova M. G., Hakim Jel' Mabruki, Novikova E. K. Nefroprotektornaja i antifibroticheskaja aktivnost' kompozicii ekstraktov iz nadzemnyh chastej *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae), *Bidens tripartite* i *Solidago canadensis* (asteraceae) pri toksicheskih nefropatijah // Rastitel'nye resursy. [Mabruki, Novikova EK Nefroprotective and antifibrotic activity of the composition of extracts from aboveground hours. *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae), *Bidens tripartita* and *Solidago canadensis* (Asteraceae) in toxic nephropathies // Plant resources.] 2017. № 53(2). P. 265–283.]
10. Хмелев В. Н., Сливин А. Н., Барсуков Р. В., Цыганок С. Н., Шалун А. В. Применение ультразвука в промышленности. – Бийск: Алт. гос. техн. ун-т. – 2010, 203 с. [Hmelev A. N. Slivin A. N., Barsukov R. V., Cyganok S. N., Shalunov A. V. Primenenie ul'trazvuka v promyshlennosti. [Application of ultrasound in industry.] – Bijsk: Alt. gos. tehn. un-t. – 2010, 203 c.]

УДК 615.322

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИСТЬЕВ И ТРАВЫ *INULA VISCOSA* (L.) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ

Р. Мусса^{1*}, Н. В. Шинева¹, В. В. Вандышев¹, С. Н. Суслина¹

Резюме. В статье рассматривается фрагмент комплексного исследования по введению в фармацевтическую практику девясила липкого (*Inula viscosa* L.). Девясил липкий (*Inula viscosa* L.) – растение, произрастающее в Сирии, водные извлечения из которого, а также порошок листьев используются этномедициной Средиземноморья при лечении дермато локализованных патологий. Исходя из опубликованных научных данных по антимикробной активности и выявленных перспектив получения и использования препаратов на основе *Inula viscosa* L., проводится фармакогностическое и технологическое изучение сырья листьев и травы с использованием современных фармакопейных методов исследования и стандартизации. Представлены результаты исследования некоторых технологических и фармакогностических характеристик новых видов сырья: листьев и травы девясила липкого (*Inula viscosa* L.). Установлены показатели качества сырья: влажность листьев – не более 5%, травы – не более 8%, содержание золы общей в листьях и траве – не более 11%, а золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, – не более 1% в обоих видах сырья, содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, – около 32%. Изучены технологические характеристики измельченного сырья: насыпная масса, объемная масса, коэффициенты поглощения растворителей с различным содержанием этанола, на основании значений которых в качестве экстрагента для получения извлечения выбран 70% этанол, как извлекающий многокомпонентный целевой комплекс веществ, включающий фенольные кислоты, флавоноиды, танины, сесквитерпеноиды. Установлены коэффициенты поглощения этого экстрагента: 1,15 мл/г – для травы и 1,22 мл/г – для листьев. Для установления подлинности сырья предложено использование ТСХ водного и спиртового извлечения для обнаружения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот – кофейной, хлорогеновой. В УФ-спектре спиртового извлечения из ЛРС девясила липкого выявлены два максимума поглощения при длинах волн 298 и 329 нм, что позволяет предполагать присутствие в извлечении фенолкарбоновых кислот других фенольных соединений, в том числе дубильных веществ и флавоноидов. Полученный спектр поглощения может служить специфичной характеристикой для установления подлинности лекарственного растительного сырья и извлечения *Inula viscosa* L. Для разработки технологии экстракта определен фракционный состав измельченного сырья девясила липкого. В измельченной траве девясила липкого основную массу (около 44%) составляет фракция, размеры частиц которой больше 2 мм, тогда как в измельченных листьях преобладает (около 45%) фракция более мелких частиц размером менее 2 мм, но более 1 мм. Полученные данные предполагается использовать для разработки проектов нормативной документации на сырье девясила липкого и технологии получения экстракционных препаратов на его основе.

Ключевые слова: *Inula viscosa* (L.), сырье, листья, трава, показатели качества, технологические характеристики, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды.

STUDY OF QUALITY INDICATORS AND TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LEAVES, STEMS AND FLOWERS OF *INULA VISCOSA* (L.) AS PROMISING RAW MATERIALS

R. Mussa^{1*}, N. V. Sineva¹, V. V. Vandyshev¹, S. N. Suslina¹

Abstract. The article contains information about the fragment of the complex study on the introduction of *Inula viscosa* L. to the pharmaceutical practice. *Inula viscosa* L. is a plant growing in Syria. Its aqueous extraction and leaf powder is used in the Mediterranean traditional medicine for the treatment of dermatological pathologies. Based on the published scientific data on antimicrobial activity and the identified prospects for the production and use of preparations based on *Inula viscosa* L., a pharmacological and pharmacognostic study of leaf and herb raw materials is carried out using modern pharmacopoeial methods of research and standardization. The results of research of some pharmacognostic characteristics of new types of raw materials are presented for *Inula viscosa* L. leaves and herb. Quality indicators of raw materials are established: moisture content in leaves is not more than 5%, amount of herb is not more than 8%, ash content is not more than 11% in leaves and herb and ash, insoluble in 10% solution of hydrochloric acid is not more than 1% in both types of raw materials, content of substances extracted by water is about 32%. The technological characteristics of the crushed raw materials are studied: bulk density, bulk mass, absorption coefficients of solvents with different ethanol content, based on the values of which 70% ethanol is selected as extractant for extraction. 70% ethanol is able to extract a multicomponent target complex of substances including phenolic acids, flavonoids, tannins, sesquiterpenoids. The absorption coefficients of this extractant are 1,15 ml/g for herb and 1,22 ml/g for leaves. TLC is proposed for the identification of the plant raw materials and for the detection of flavonoids and phenolcarboxylic acids (caffeic and chlorogenic acids) in aqueous and alcoholic extracts. There were identified two maxima of the absorption in the UV spectrum of the alcoholic extraction of *Inula viscosa* L. at wavelength 298 and 329 nm. It allows to assume the presence of phenolcarboxylic acids and other phenolic substances including tanning substances and flavonoids in the extraction. The obtained absorption spectrum can serve as a specific characteristic for identification of medicinal plant material and extraction of *Inula viscosa* L. To develop the technology of extracts, the fractional composition of the *Inula viscosa* L. crushed raw material is determined. The majority of particles (about 44%) in the crushed herb of *Inula viscosa* L. have the size more than 2 mm, while the crushed leaves represent the fraction with majority of particles (about 45%) having size less than 2 mm but more than 1 mm. The obtained data is supposed to be used for the development of the draft normative documentation for *Inula viscosa* L. raw materials and for the development of technology for obtaining extraction preparations based on it.

Keywords: *Inula viscosa* (L.), medicinal plant raw materials, technological characteristics, phenol carboxylic acids, flavonoids.

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

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

* адресат для переписки:

E-mail: ramadan.musa@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В этнофармации стран Средиземноморья, и в частности в Сирии, активно используют водное извлечение из листьев девясила липкого (*Inula viscosa* L.) в качестве противовоспалительного и ранозаживляющего средства для наружного применения. Опубликованные научные данные о биологической активности комплексов биологически активных соединений (БАС), содержащихся в этом растении, подтверждают целесообразность его углубленного изучения и применения [6, 341–354; 7, 20–26].

Девясил липкий (*Inula viscosa* (L.), или *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), относящийся к семейству астровых (сложноцветных) (Asteraceae), – полукустарник или многолетнее травянистое растение, широко распространенное в Средиземноморье и образующее заросли в степной и полупустынной местности [5, 329–331]. Основными группам БАС, накапливаемых растением, являются флавоноиды, сесквитерпеновые соединения и эфирное масло [4, 27–35; 3, 124–127]. Сырьем девясила липкого обычно служат листья, собранные с облиственных цветоносных побегов, которые в условиях жаркого сухого климата можно собирать несколько раз за сезон. Однако в перспективе рассматривается использование и верхушечной травянистой части растения – побегов длиной до 30 см.

Следует отметить, что при широком применении в этномедицине девясил липкий и его сырье не являются официальными, поэтому их стандартизация осуществляется не на должном уровне. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) Российской Федерации [1, Т. 1, ОФС.1.5.1.0001.15] для определения качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) среди других показателей определяют: влажность, содержание зольного остатка (зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной), тяжелых металлов и мышьяка. Определение содержания экстрактивных веществ с использованием различных растворителей и схем экстракции позволяет выявить наиболее подходящий экстрагент для извлечения БАС целевого фрагмента метаболома. Изучение технологических характеристик сырья, таких как насыпная масса, объемная масса, содержание экстрактивных веществ, коэффициенты поглощения экстрагентов сырьем, позволит разработать оптимальную технологию получения фитопрепарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования явились два вида сырья девясила липкого – трава и листья. Цельное сырье заготавливали в течение 2015–2017 гг. в сирийской провинции Хомс: верхушечные облиственные цветоносные побеги длиной до 30 см – в период цветения растений, хорошо развитые листья – до цветения.

Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом (ГФ XIII, «Общие методы анализа»): при комнатной температуре с умеренной вентиляцией, разложив в один слой на подстилках и периодически переворачивая.

Сырье упаковывали и хранили при комнатной температуре в сухом, хорошо вентилируемом помещении, не зараженном вредителями запасов, не допуская попадания на сырье прямых солнечных лучей.

Измельчение высушенных травы и листьев *Inula viscosa* проводилось на электрической мясорубке (Nova Meat Grinder).

Для определения дисперсного состава частиц измельченное сырье просеивали через ряд сит с отверстиями различных размеров – от 2,50 мм до 0,25 мм. Исползованные сита отвечают требованиям ТУ 23.2.2068-89. Оценка фракционного состава сырья девясила липкого осуществлялась в соответствии со статьей ГФ XIII ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ».

Определение сыпучести измельченного сырья девясила липкого проводили в соответствии с методикой ГФ XIII, приведенной в ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков». Для определения данной характеристики сырья использовали тестер для определения сыпучести гранулята ERWEKA Granulate Flow Tester GT (ERWEKA, Германия).

Определение насыпного объема измельченного сырья девясила липкого проводили в соответствии с методикой ГФ XIII, приведенной в ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков», на тестере насыпной плотности ERWEKA SVM 101/201 Tapped Density Tester (ERWEKA, Германия).

Определение влажности сырья девясила липкого проводили согласно методике, приведенной в ОФС.1.5.3.0007.15, с помощью влагомера термографи-



Тестер для определения сыпучести гранулята ERWEKA GT



Тестер насыпной плотности ERWEKA серии SVM

ческого инфракрасного «Аквилон АВ-50» (ЗАО «НПКФ Аквилон», Россия).

Изучение содержания общей золы и золы, нерастворимой в 10% хлористоводородной кислоте, проводили согласно ОФС.1.2.2.2.0013.15 и ОФС.1.5.3.0005.15 ГФ XIII.

Изучение коэффициентов поглощения различных экстрагентов (воды, водного спирта различной концентрации) и расходных коэффициентов видов сырья девясила липкого проводили по методике, изложенной в ОФС.1.5.3.0012.15. При исследовании коэффициентов поглощения различных экстрагентов сырье заливали растворителями в соотношении 1:10. После экстракции в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» и ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки» извлечения фильтровали и шрот отжимали в перфорированном стакане, после чего измеряли объем полученного извлечения.

При определении содержания экстрактивных веществ в сырье девясила липкого была применена многократная экстракция согласно ОФС.1.5.3.0006.15.

При установлении подлинности сырья по целевым группам БАС были использованы УФ-спектрофотометрия и ТСХ. Для экстракции и приготовления хроматографических систем использовали растворители марки «ч.» и «х.ч.», производства «Химмед» (Россия). Концентрирование извлечений и отгонку растворителей проводили с помощью ротационного испарителя Heidolph® Laboratory 4002, (Heidolph, Германия).

Спектры в УФ- и видимой области спектра регистрировали с помощью спектрофотометра Cary WIN UV (Varian, США) в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Идентификацию и разделение веществ осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Fluka (Merck, Германия) с силикагелем на алюминиевой подложке и флуоресцентным индикатором 254 нм. Испытание методом ТСХ проводили в системе н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:1) – все растворители марки «ч.» производства «Химмед», Россия. Обнаружение зон адсорбции в УФ-свете проводили при длине волны 365 нм до и после обработки хроматораммы последовательно растворами дифенилборилоксиэтиламина SigmaAldrich (Германия) и полиэтиленгликоля-400 (Ferak, Германия). В качестве испытуемого раствора использовали извлечения из ЛРС, в качестве стандартных растворов – таковые рутина (содержание 90,00%, Carl Poth GmbH, Германия, серия 250249-75-3, годен до 01.12.2019), кофейной кислоты (содержание 98,00%, Sigma, Швейцария, серия 047k1609, годен до 01.09.2019), галловой кислоты (содержание 98,00%, Sigma, Китай, серия 117k0057, годен до 01.09.2019) в этаноле (95% ОАО Флора Кавказа, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения числовых показателей сырья девясила липкого приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Числовые показатели двух видов сырья девясила липкого

Числовой показатель	Трава девясила липкого	Листья девясила липкого
Влажность, %	7,05±0,5	3,78±0,10
Зола общая, %	10,4±0,5	10,75±0,5
Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	0,997±0,03	0,645±0,03

Как видно из представленных в таблице данных, влажность образцов травы девясила не превышала 8%, а влажность листьев – 5%, что соответствует уровню значений для официального сырья этих морфологических групп – не более 14%. Содержание золы общей в траве установлено порядка 10%, а золы, нерастворимой в 10% растворе HCl, в траве – до 1%, а в листьях – до 0,7%, что составляет не более 10% от золы общей. Сравнение показателей зольности свидетельствует о низком содержании в сырье девясила липкого элементов, не образующих с соляной кислотой растворимых в воде солей.

Исследования по выявлению приемлемого экстрагента, максимально извлекающего комплекс БАС из травы и листьев девясила липкого, проводили с использованием нескольких растворителей: спирта этилового различной концентрации (90, 70 и 40%) и воды очищенной. Результаты определения содержания экстрактивных веществ представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Содержание экстрактивных веществ в двух видах сырья девясила липкого

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %	
	трава	листья
Вода очищенная	31,22±1,5	31,18±1,5
Спирт этиловый 40%	31,27±1,5	32,70±1,5
Спирт этиловый 70%	27,28±1,5	32,42±1,5
Спирт этиловый 90%	23,61±1,5	29,89±1,5

Из данных таблицы 2 видно, что сопоставимо высокий выход (30–31%) экстрактивных веществ как из травы, так и из листьев достигается при экстракции этих видов сырья водой и водно-этанольным раствором с низким содержанием спирта. Содержание же гидрофобных веществ, переходящих в более крепкие спиртоводные смеси, в листьях несколько выше, чем в траве. Таким образом, учитывая уровень содержания экстрактивных веществ в сырье девясила липкого при извлечении их водой и 40% этанолом,

целесообразно использовать для стандартизации показатель «содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой».

Результаты изучения поглощающей способности сырья девясила липкого в отношении различных экстрагентов представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Коэффициенты поглощения двух видов измельченного сырья девясила липкого в зависимости от растворителя

Экстрагент	Коэффициент поглощения, мл/г	
	травы девясила липкого	листьев девясила липкого
Вода очищенная	1,85±0,08	1,65±0,07
Спирт этиловый 40%	1,35±0,05	1,35±0,06
Спирт этиловый 70%	1,15±0,05	1,22±0,05
Спирт этиловый 90%	1,12±0,05	1,15±0,05

Как видно из данных таблицы 3, наибольшим коэффициентом поглощения как трава, так и листья (1,85–1,65 мл/г) девясила обладают в случае экстракции водой. В случае спиртоводных вариантов экстрагента трава и листья удерживают примерно в 2 раза меньше растворителя и коэффициент поглощения находится в интервале 1,12–1,35 мл/г. Такое различие может быть обусловлено наличием в исследованном сырье полисахаридного комплекса.

Для разработки технологии получения экстрактов нами определены фракционный состав и некоторые технологические параметры отдельно для каждого вида измельченного сырья девясила липкого. Результаты этих исследований приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4.

Фракционный состав частиц измельченного сырья девясила липкого

Частиц на сите с отверстиями размером:	Содержание фракции, %	
	трава	листья
3 мм	0,36	0,17
2 мм	43,84	29,60
1 мм	33,36	45,33
0,5 мм	11,12	14,43
0,1 мм	9,36	9,13
Частиц, прошедших сквозь сито 0,1 мм	1,96	1,34

Данные таблицы 4 показывают, что в измельченной траве девясила липкого основную массу (около 44%) составляет фракция, размеры частиц которой больше 2 мм, тогда как в измельченных листьях преобладает (около 45%) фракция более мелких частиц размером менее 2 мм, но более 1 мм.

Таблица 5.

Технологические характеристики измельченного сырья девясила липкого

Название технологической характеристики сырья	Вид сырья девясила липкого	
	трава	листья
Насыпной объем до уплотнения, мл	80	80
Насыпной объем после уплотнения (1250), мл	69,5	66,5
Насыпная плотность до уплотнения, г/см ³	0,36	0,37
Насыпная плотность после уплотнения, г/см ³	0,42	0,44
Коэффициент поглощения сырья при экстракции 70% этанолом, мл/г	1,15	1,22

На основании ранее полученных результатов [2, 93–99] в качестве растворителя для получения извлечения выбран 70% этанол как экстрагент многокомпонентного целевого комплекса БАС (фенольные кислоты, флавоноиды, танины, сесквитерпеноиды), коэффициенты поглощения которого составляют 1,15 мл/г и 1,22 мл/г для травы и листьев соответственно.

В спектре спиртового извлечения из ЛРС девясила липкого в УФ-области отмечается два максимума поглощения при длинах волн 298 и 329 нм. На основании этих данных можно предположить присутствие в извлечении фенолкарбоновых кислот, а также других фенольных соединений (дубильных веществ, флавоноидов). Полученный спектр поглощения может служить специфичной характеристикой для установления подлинности извлечения и ЛРС из *Inula viscosa* (рисунок 1).

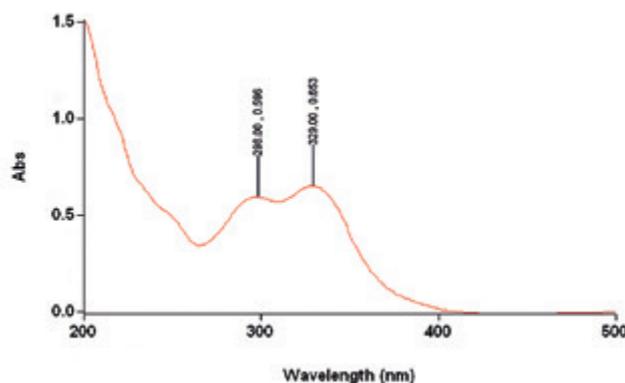


Рисунок 1. УФ-спектр поглощения извлечения 70% спиртом этиловым из сырья девясила липкого

При проведении ТСХ спиртоводного извлечения из листьев девясила липкого были получены данные, приведенные на рисунке 2.

На хроматограмме стандартных растворов видны зоны рутина с Rf около 0,58, кофейной кислоты с Rf около 0,75 и галловой кислоты с Rf около 0,76.

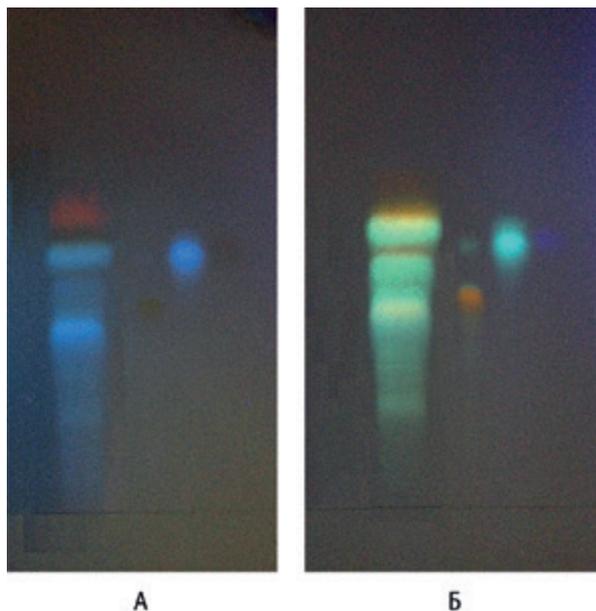


Рисунок 2. Результаты хроматографирования извлечения из листьев девясила липкого:

А – вид ТСХ в УФ-свете до обработки реактивами.

Б – вид ТСХ в УФ-свете 365 нм после опрыскивания реактивами

На хроматограмме испытуемого извлечения в УФ-свете при 365 нм обнаруживается ряд зон с голубой флуоресценцией (фенолкарбоновые кислоты), самые интенсивные из которых имеют R_f около 0,30 (эта растянутая зона относится к хлорогеновой кислоте), 0,52 и 0,76 (соответствует кофейной кислоте). Видны также зоны коричневатого цвета (сливаются с зонами голубого цвета), одна из которых на уровне пятна стандарта рутина, другая – чуть выше зоны стандарта галловой кислоты. Ближе к фронту подвижной фазы присутствует зона красного цвета, обусловленная хлорофиллом.

После опрыскивания хроматограммы метанольными растворами дифенилборилоксиэтиламина и полиэтиленгликоля-400 зоны, относящиеся к фенолкарбоновым кислотам, приобретали сине-зеленоватую флуоресценцию, зоны флавоноидов с R_f около 0,58, 0,68 и 0,77 – оранжевую, а пятно галловой кислоты – фиолетовую. Последнюю трудно различить на ТСХ испытуемого раствора из-за наложения на нее зон фенолкарбоновых кислот.

Таким образом, определение качественного состава БАС показало наличие фенольных веществ, среди которых преобладают фенолкарбоновые кислоты, в частности хлорогеновая и кофейная.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами были определены некоторые числовые показатели, характеризующие качество двух новых видов сырья (трава и листья) девясила липкого, произрастающего в Сирии. Установлены технологические парамет-

ры измельченных видов сырья, предназначенных для экстракции БАС. Определен качественный состав фенольных соединений в сырье, среди которых преобладают хлорогеновая и кофейная кислоты. Использование полученных данных позволит разработать проект нормативной документации на сырье девясила липкого и технологию получения экстракционных препаратов на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея, XIII изд. Т. 1 / МЗ РФ. М., 2015. 1470 с. [Gosudarstvennaya farmakopeya, XIII izd. [State Pharmacopoeia, XIII ed.]. Т. 1. М., 2015. 1470 p.]
2. Мусса Р., Шинева Н. В., Суслина С. Н. Фармакогностическая характеристика сырья и целевого фрагмента метаболома *Inula viscosa* // Пятая научно-практическая конференция с международным участием: «Молодые учёные и фармация XXI века» / Сб. науч. трудов, М., ВИЛАР, 2017 г. С. 93–99. [Mussa R., Shineva N. V., Suslina S. N. Farmakognosticheskaja harakteristika syr'ja i celevogo fragmenta metaboloma *Inula viscosa* // Pjataja nauchno-prakticheskaja konferencija s mezhdunarodnym uchastiem: «Molodye uchjonye i farmacija XXI veka» / Sb. nauch. trudov. [Pharmacognostic characteristics of raw materials and the target fragment of the metabolite *Inula viscosa* // The fifth scientific and practical conference with international participation: «Young Scientists and Pharmacy of the XXI Century» / Collection of scientific papers]. М., ВИЛАР, 2017. P. 93–99.]
3. Fontana G., La Rocca S., Passannanti S. Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa* // Natural Product Research. 2007. № 4. P. 124–127.
4. Parolin P., Ion Scotta M., Bresch C. Notes on the phenology of *Dittrichia viscosa* // Journal of Mediterranean Ecology. 2013. V. 12. P. 27–35
5. Máñez S., Hernández V., Giner R. M. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa* // Fitoterapia. 2007. № 78. P. 329–331.
6. Brullo S., De Marco G. Taxonomical revision of genus *Dittrichia* (Asteraceae) // Portugaliae Acta Biol. 2000. № 19. P. 341–354.
7. Amin S., Kaloo Z. A., Singh S., Altaf T. Medicinal importance of genus *Inula*- a review // Int. J. Cur. Res. Rev. 2013. № 5. P. 20–26.



- дозирование жидких субстанций в пластиковые и стеклянные флаконы с дальнейшей укупоркой крышками
- точные шприцевые дозаторы (4 или 6) обеспечивают минимальное вспенивание и розлив любых объемов
- производительность: 4 200 – 7 200 единиц/час
- автоматическое управление, в т.ч. автоматическая передача флаконов на этикетировку
- быстрая перенастройка форматов
- закрытие флаконов одним или несколькими закупоривающими приспособлениями
- непрерывная подача флаконов на розлив

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ЛИНИЯ РОЗЛИВА

FC



Тесномасо: МЫ ДЕЛАЕМ ТОЛЬКО САМОЕ ЛУЧШЕЕ!

УДК 615.4

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗ ПРОТИВООЖГОВЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ, В ТОМ ЧИСЛЕ СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ

И. А. Самкова^{1*}, О. А. Мельникова¹, А. Ю. Петров¹

Резюме. В данной статье представлены опытно-промышленные регламенты многокомпонентных лекарственных форм для наружного применения, в том числе содержащих наночастицы. Данные формы разработаны на основе фармацевтической композиции «Новокомб», обладающей антисептическим, местноанестезирующим и пролонгирующим действием. Наше предпочтение было отдано следующим формам: раствору для наружного применения, мази и салфетке для наружного применения. Оценку полученных лекарственных форм проводили по таким показателям, как подлинность, цветность, pH, содержание действующих веществ. Проведена оценка противомикробной активности и фармакологического действия, на основе которого представлен принцип действия композиции на модели ожоговой травмы.

Ключевые слова: антисептик, местноанестезирующее средство, наночастицы железа, «Новокомб».

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND ANALYSIS OF ANTIFOOD MULTICOMPONENT MEDICINAL FORMS, INCLUDING CONTAINING NANOPARTICLES

I. A. Samkova^{1*}, O. A. Melnikova¹, A. Yu. Petrov¹

Abstract. In this article, experimental-industrial regulations for multi-component dosage forms for external use, including those containing nanoparticles, are presented. These forms are developed on the basis of the pharmaceutical composition "Novocomb", which has antiseptic, local anesthetic and prolonging action. Our preference was given to the following forms: external solution, ointment and napkin for external use. Evaluation of the obtained dosage forms was carried out for such indicators as authenticity, chromaticity, pH, content of active substances. An evaluation of antimicrobial activity and pharmacological action was performed, on the basis of which the principle of action of the composition on the burn injury model is presented.

Keywords: antiseptic, local anesthetic, iron nanoparticles, Novokomb.

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

1 – Ural State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Repina str., Ekaterinburg, 620028, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: aerinel@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фармацевтическая технология лекарственных средств постоянно развивается и совершенствуется [1–3]. Появляющиеся новые технологии позволяют реализовать более сложные цели и задачи. Одним из важных направлений реализации данных стратегий является создание многокомпонентных лекарственных форм с наночастицами. На практике это приводит к большому диапазону лечебных свойств лекарственной формы за счёт вклада каждого компонента. При рациональном сочетании компонентов терапевтические возможности лекарственного средства расширяются, что обуславливает актуальность их исследования.

При лечении ожогов очень важным для лекарственного препарата является наличие антисептических свойств (для устранения микробной контаминации), местных анестезирующих (для купирования болевых ощущений), транспортной доступности (для быстрой доставки в глубь ожога). Данное фармакологическое действие может быть достигнуто путем использования в качестве исходных ингредиентов следующих фармацевтических субстанций: йода, новокаина, поливинилпирролидона (ПВП) и нанокomпонентов (на основе частиц железа Fe_3O_4 , $Fe@C$). Последние обладают хорошей проникающей способностью, увлекая за собой действующее вещество и ускоряя процесс заживления раны. При создании данной фармацевтической субстанции при-

Таблица 1.

Состав фармацевтической композиции

Компонент	Процентное соотношение
Йод	3%
Новокаин	14%
Поливинилпирролидон	83%

нималось во внимание то, что йод является известным лекарственным препаратом и широко используется в медицине в качестве раствора йода спиртового 5% для местного и наружного применения. Комплекс йода с поливинилпирролидоном лежит в основе препарата йодопирон, обладающего антисептическими (за счёт йода) и ранозаживляющими (за счёт поливинилпирролидона) свойствами.

Преимущество данной лекарственной формы перед аналогами заключается в том, что в её состав введён комплекс йода с поливинилпирролидоном. Матрица поливинилпирролидона удерживает йод и способствует его высвобождению. За счёт этого механизма обеспечивается противомикробное, антисептическое, дезинфицирующее, противогрибковое и антипротозойное действие.

Обезболивающие свойства субстанции-порошка достигаются введением в его состав местного анестезирующего средства – новокаина.

В настоящее время в ГРЛС представлены растворы для наружного применения (меновазин), в которых концентрация местноанестезирующих компонентов (новокаин, анестезин) достигает 5%. В связи с этим нами разрабатывались формы для наружного применения. При выборе концентрации новокаина мы руководствовались содержанием анестезина в наружных лекарственных формах, близких по составу, но не идентичных (рисунок 1).

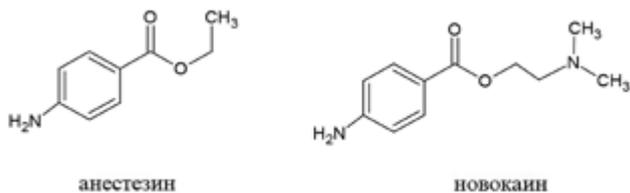


Рисунок 1. Формулы анестезина и новокаина

На фармацевтическом рынке есть суппозитории, содержание анестезина в которых составляет до 10,3%. При использовании суппозитория лекарственное вещество всасывается со слизистой оболочки. В нашем случае всасывание происходит с наружной оболочки из полимерной матрицы, что требует повышения концентрации местноанестезирующего средства до 14% и затем его последовательного высвобождения. Новокаин был выбран в связи с тем, что данное лекарственное средство имеет удлиненную углеродную цепочку и третичную аминогруппу (в отличие от анестезина), за счет которой он лучше взаимодействует с йодом, что доказано использованием йода в качестве осадительного реактива на третичную аминогруппу (таблица 1).

Анализируя данные маркетинговых исследований [4, 5], можно сделать вывод о том, что наибольший интерес представляют такие лекарственные формы, как раствор, мазь и перевязочные средства. Разработка разных наружных лекарственных форм (рисунок 2) производится на основе фармацевтической композиции «Новокомб», состоящей из йода, новокаина и матрицы поливинилпирролидона (патент RU № 2519090 С1) [6], вследствие чего она обладает комплексом антисептических, местноанестезирующих свойств.

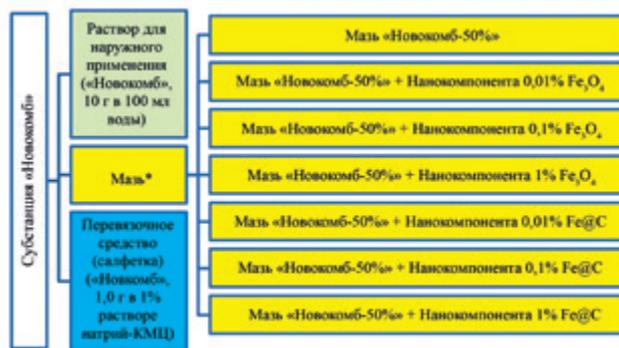


Рисунок 2. Лекарственные формы, полученные на основе фармацевтической композиции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования была использована субстанция «Новокомб», состоящая из следующих компонентов: йода (ГФ XIII ФС.2.2.0007.15), поливинилпирролидона (ПВП) (Mr=30000±5000 г/моль; ЛС-001230-041013), новокаина (ФС 42-0265-07). Для изготовления раствора для наружного применения использовалась вода очищенная (ФС.2.2.0020.15). При производстве мягкой лекарственной формы использовался спирт этиловый 95% (ФС.2.1.0036.15), ПЭГ-400 (ТУ 2483-007-71150986-2006), ПЭГ-1000 (ТУ 2483-007-71150986-2006). При изготовлении перевязочных средств в качестве вспомогательного вещества использовалась натрийкарбоксиметилцеллюлоза (ТУ 2231-001-68373646-2010). Применяемые в исследовании вещества отвечали требованиям соответствующих ФС или соответствовали квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.».

Технология изготовления лекарственных средств включает следующие этапы: вспомогательные рабо-

ты (подготовка персонала, аппаратуры и оборудования, помещений, ингредиентов, сырья), стадии технологического процесса (получение раствора, оценка качества) и заключительные операции (упаковка, маркировка).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработку технологической схемы раствора для наружного применения (рисунок 3) проводили принимая во внимание, что средство представляет собой водный раствор твердого вещества.

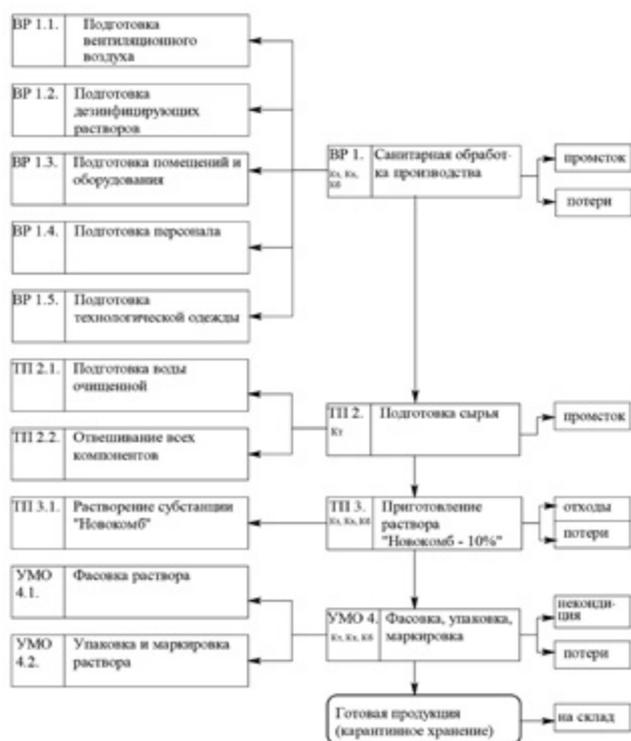


Рисунок 3. Технологическая схема получения раствора для наружного применения. Кт, Кх, Кб – контроль технологический, химический и биологический соответственно

Такие стадии, как санитарная обработка производства, являются идентичными независимо от лекарственной формы. Технологический процесс получения раствора для наружного применения представлен одной стадией: в химический стакан в смеситель вертикальный с комбинированной мешалкой вносят субстанцию «Новокомб» (50 г) и добавляют воду очищенную (500 мл). Для полного растворения субстанции подвергают раствор перемешиванию при скорости вращения 400 об/мин в течение 30 минут. Полученный раствор для наружного применения расфасовывают во флаконы из оранжевого стекла с винтовой горловиной (ГОСТ 19808-86) по 100 мл, затем в пачки картонные.

При разработке мази особое внимание уделялось мазевой основе. Для обоснования состава ингредиентов при разработке мягкой лекарственной фор-

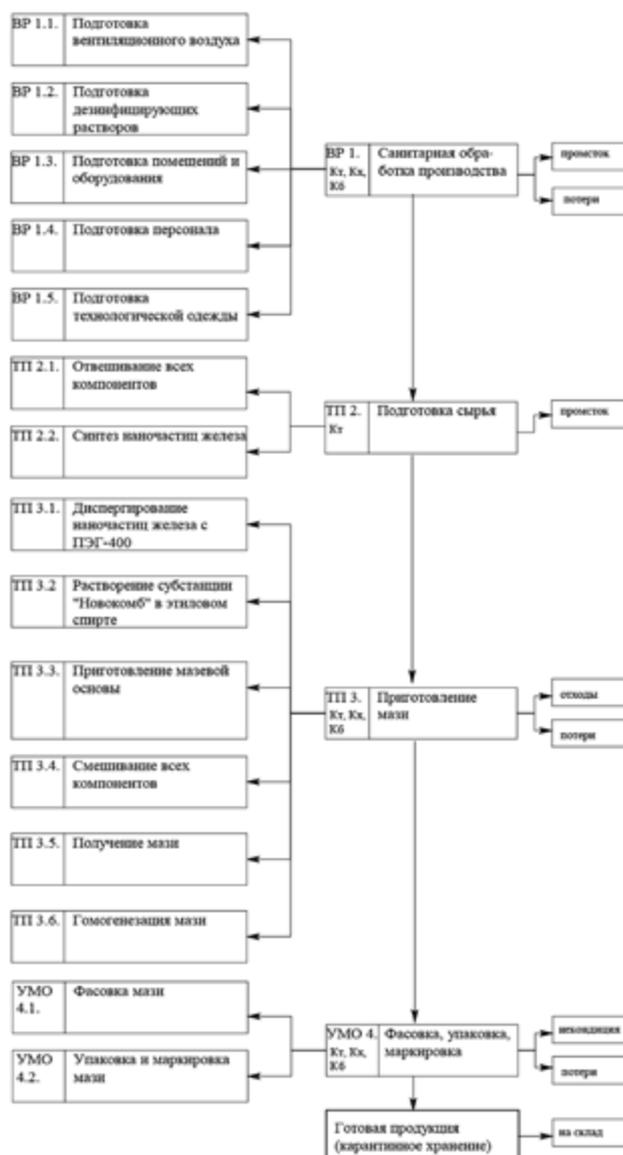


Рисунок 4. Технологическая схема производства мази. Кт, Кх, Кб – контроль технологический, химический и биологический соответственно

мы исходили из того, что критерием выбора мазевой основы являлись прежде всего однородность, хорошая текучесть и оптимальная липкость. В состав мазевых композиций входили ПЭГ-4000, ПЭГ-1000, ПЭГ-400, вода, тальк, глицерин и спирт. В результате были сконструированы 9 модельных образцов (таблица 2).

Технологический процесс получения основы для мягкой лекарственной формы заключался в сплавлении ингредиентов основы с введением вспомогательных веществ при соответствующем температурном режиме, выливанием в банки для мазей с последующим охлаждением.

Полученные модельные образцы основ для мазей (под номерами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) на первом этапе исследования были исключены ввиду визуального анализа следующих характеристик:

- жидкая консистенция образцов, не позволяющая наносить их на кожу (образцы 4, 8);
- неоднородность основы (наблюдаются частицы, видимые невооруженным глазом) (образцы 1, 3, 6);
- комковатость при нанесении на кожу (образцы 2,7);
- расслаивание при длительном хранении с выделением жидкого содержимого (образец 5).

В результате в качестве основы был выбран модельный состав под номером 9.

Таблица 2.

Составы основы для мягких лекарственных форм

Наименование компонентов мазевых основ	№ состава								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ПЭГ-1000, г	2	4,5		3		3		4	2
ПЭГ-4000, г	2	2,5	5,5	3	7	4	4	-	-
ПЭГ-400, мл	1	2	1,5	2	1,5	1,5	2	2	8
Вода, мл	-	2	1,5	2	1,5	1,5	2	2	
Глицерин, мл	-	-	1,5	-	-	-	2	2	
Тальк, г	-	-	-	-	-	-	0,1	-	

Более подробно ознакомимся с технологией производства мягкой лекарственной формы, предварительно подготовив необходимое количество ингредиентов. На 1000 г мази необходимо взять: 80,0 г ПЭГ-1000, 350,0 г ПЭГ-400, 440,0 г субстанции «Новокомб», 440,0 г спирта этилового 95% и требуемое количество железноуглеродных наночастиц Fe@C и Fe₃O₄.

Наночастицы Fe₃O₄ и Fe@C (железо, покрытое углеродной оболочкой), используемые в данной работе, были получены левитационно-струйным методом в среде газа-носителя (или, иначе, методом газофазного синтеза). Металл, в данном случае железо, разогревается высокочастотным магнитным полем до температуры 2100 °С, находясь в токе инертного газа-носителя, уносящего капли металла. При этом к газу-носителю дополнительно примешивается кислород (для получения оксидных наночастиц) или смесь углеводородов (для получения наночастиц, покрытых углеродной оболочкой).

Процесс получения состоит из нескольких стадий. На первом этапе добавляем наночастицы магнетита к раствору ПЭГ-400. Проводили диспергирование полученной смеси при помощи УЗ-генератора 3 раза при постоянном контроле экзотермического эффекта, температура которого не должна превышать 40 °С. На втором этапе растворяли субстанцию «Новокомб» в спирте этиловом 95% путем перемешивания. Третьим этапом стало приготовление мазевой основы: в емкость загружали необходимое количество ПЭГ-1000, которое плавил в течение 10 мин при температуре 65±5 °С. На четвертом этапе проводили смешивание смеси ПЭГ-400 и наночастиц магнетита со спиртовым раствором «Новокомб» и добавляли полученную ком-

позицию к расплавленному компоненту (ПЭГ-1000). Перемешивали все компоненты до однородной консистенции. На пятом этапе полученную композицию обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин, таким образом осуществляя процесс гомогенизации.

Мазь «Новокомб-50%» расфасовывают в алюминиевые тубы по 25 г по ТУ 64-7-678-90, покрытые внутри лаком на основе клея БФ-2 или лаком ЭП-5186, или в полиэтиленовые банки по 50 г.

При производстве перевязочного средства немаловажным этапом является выбор материала пропитывающей основы. Для обоснования выбора перевязочного материала исходили из того, что он должен обладать всасывающей способностью, не подвергаться воздействию окисляющих веществ, обладать воздушной проницаемостью и оптимально контактировать с раневой поверхностью. В качестве основы нами была выбрана канва, соответствующая данным требованиям.

Подготовка к технологическому процессу заключалась в отвешивании компонентов: на 300 салфеток, изготовленных из сетчатой хлопчатобумажной ткани, необходимо взять 9,0 г натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, 30,0 г субстанции «Новокомб», 900,0 мл воды очищенной. Технологический процесс получения перевязочного материала состоял из трех последовательных этапов (патент RU № 2519662 С1) [7] (рисунк 5).

На первом этапе готовили 1% водный раствор натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. На втором этапе к полученной смеси добавляли субстанцию «Новокомб» и перемешивали полученную композицию до полного растворения. На третьем этапе в раствор опускали материал размером 10×10 см и пропитывали его в течение 15 мин до появления равномерной окраски. Затем сушили в темном месте при комнатной температуре.

Салфетку темно-коричневого цвета запаковывали в непрозрачный полиэтилен (ГОСТ 16338).

Другим аспектом нашей работы была оценка качества полученных лекарственных форм. Изучали следующие показатели: описание, прозрачность (ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0007.15), цветность (ОФС.1.2.1.0006.15), рН, подлинность произведенного средства (качественные реакции на йод, новокаин, ПВП), содержание действующих веществ, антимикробную активность в отношении стандартных тест-культур микроорганизмов, скорость заживления раневой травмы у животных [8], а также стабильность (ГФ XIII, ОФС.1.1.0009.15). Результаты исследования приведены в таблице 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные исследования позволяют заключить, что на основе субстанции «Новокомб» изготовлены многокомпонентные лекарственные фор-

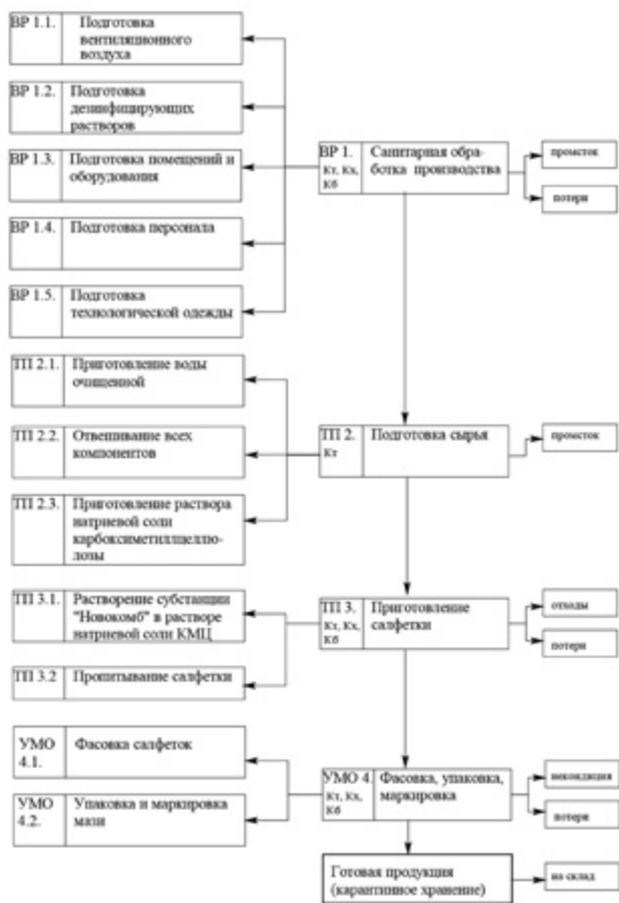


Рисунок 5. Технологическая схема получения салфетки. Кт, Кх, КБ – контроль технологический, химический и биологический соответственно

мы для наружного применения, которые обладают антисептическим, местноанестезирующим и пролонгирующим действием за счет матрицы ПВП. При наличии нанокomпонентов в композиции происходит усиление репаративного действия.

Разработаны технологии производства раствора для наружного применения, мягких лекарственных форм. Представлена особая стадия введения нанокomпонентов в мази. Предложен принцип действия разработанной многокомпонентной лекарственной формы, содержащей наночастицы, на модели ожоговой травмы. Разработан и обоснован состав перевязочного средства, спроектирована его технологическая схема.

Проведен фармацевтический анализ полученных многокомпонентных лекарственных форм, в том числе содержащих наночастицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пестрикова Н. В., Карпова Е. М., Мазина Н. К. Современные аспекты создания лекарственных форм как предпосылка разработки новых фармакотерапевтических технологий (обзор литературы) // Вятский медицинский вестник. 2009. № 2–4. С. 26–30. [Pestrikova N. V., Karpova E. M., Mazina N. K. Sovremennye aspekty sozdaniya lekarstvennykh form kak predposylka razrabotki novykh farmakoterapevticheskikh

tehnologii (obzor literatury) // Vyatskii meditsinskii vestnik. [Modern aspects of the creation of dosage forms as a prerequisite for the development of new pharmacotherapeutic technologies (review of the literature) // Vyatsky medical bulletin.] 2009. № 2–4. S. 26–30.]

2. Сысуйев Б. Б., Степанова Э. Ф. Обоснование возможности использования методов планирования эксперимента с целью оптимизации биофармацевтических исследований при разработке мягких лекарственных форм // Фундаментальные исследования. 2011. № 10-1. С. 200–203. [Sysuyev B. B., Stepanova E. F. Obosnovanie vozmozhnosti ispol'zovaniya metodov planirovaniya eksperimeta s tsel'yu optimizatsii biofarmatsevticheskikh issledovaniy pri razrabotke myagkikh lekarstvennykh form // Fundamental'nye issledovaniya. [Substantiation of the possibility of using experimental planning methods to optimize biopharmaceutical research in the development of soft medicinal forms // Fundamental Research.] 2011. № 10-1. S. 200–203.]
3. Демина Н. Б. Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 38–46. [Demina N. B. Farmatsevticheskaya razrabotka: obzor oborudovaniya dlya laboratornoi razrabotki i narabotki opytnykh partii tverdykh lekarstvennykh form // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Pharmaceutical development: review of equipment for laboratory development and development of pilot lots of solid dosage forms // Development and registration of pharmaceuticals.] 2016. № 1(14). S. 38–46.]
4. Мельникова О. А., Самкова И. А., Маханькова Л. А. Методика измерений и алгоритмы определения лекарственных веществ в многокомпонентных смесях // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2015. № 4 (201). С. 180–184. [Mel'nikova O. A., Samkova I. A. Makhan'kova L. A. Metodika izmerenii i algoritmy opredeleniya lekarstvennykh veshchestv v mnogokomponentnykh smesyakh // Nauchnye vedomosti BelGU. Seriya: Meditsina. [Methods of measurement and algorithms for the determination of drug substances in multicomponent mixtures. // Scientific statements of BelGU. Series: Medicine.] Farmatsiya. 2015. № 4 (201). S. 180–184.]
5. Мельникова О. А., Самкова И. А. Анализ фармацевтического рынка противоожоговых лекарственных препаратов для наружного применения Российской Федерации // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2016. № 12(233). С. 150–158. [Mel'nikova O. A., Samkova I. A. Analiz farmatsevticheskogo rynka protivoozhogovykh lekarstvennykh preparatov dlya naruzhnogo primeneniya Rossiiskoi Federatsii // Nauchnye vedomosti BelGU. Seriya: Meditsina. [Analysis of the pharmaceutical market of anti-burn medicines for external use of the Russian Federation // Scientific bulletins of the BelSU. Series: Medicine.] Farmatsiya. 2016. № 12(233). С. 150–158.]
6. Самкова И. А., Мельникова О. А. Формирование и оценка потребительских свойств перевязочных средств методом маркетинговых исследований // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. № 1. [Samkova I. A., Mel'nikova O. A. Formirovanie i otsenka potrebitel'skikh svoystv perevyazochnykh sredstv metodom marketingovykh issledovaniy // Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii. Elektronnoe izdanie. [Ormaton and evaluation of consumer properties of dressings by the method of marketing research // Vestnik of new medical technologies. Electronic edition.] 2014. № 1.]
7. Патент РФ 2519090, МПК А61К 33/18, А61Р 17/02. Фармацевтическая композиция / Мельникова О. А., Петров А. Ю., Самкова И. А.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России. – № 2013112719/15; заявл. 21.03.13; опублик. 10.06.14, Бюл. № 16. 4 с.
8. Патент РФ 2519662, МПК А61Л 15/22, А61Л 15/28, А61Л 15/44. Медицинская салфетка для наружного применения / Мельникова О. А., Петров А. Ю., Самкова И. А.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России. – № 2013112720/15; заявл. 21.03.13; опублик. 20.06.2014, Бюл. № 17. 5 с.

Таблица 3.

Физические свойства полученных лекарственных форм

Срок годности	2 года	2 года	2 года	2 года	2 года	2 года	2 года	2 года	2 года		
Скорость ранозаживления ожоговой раны у крыс (в днях)		19	20		18		17		19	18	16
Микробиологические исследования (<i>Corynebacterium</i>)	25,0±0,3	18,0±0,4	15,0±0,2		8,0±0,4		5,0±0,3		16,0±0,4	18,0±0,4	15,0±0,2
Микробиологические исследования (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	13,0±0,3	12,0±0,4	10,0±0,4		13,0±0,3		8,0±0,2		0,0±0,2	12,0±0,4	10,0±0,4
Микробиологические исследования (<i>Staphylococcus aureus</i>)	20,0±0,2	13,0±0,4	20,0±0,4		12,0±0,4		10,0±0,4		0,0±0,3	13,0±0,4	20,0±0,4
Микробиологические исследования (<i>Proteus mirabilis</i>)	10,0±0,2	18,0±0,2	20,0±0,3		13,0±0,3		15,0±0,4		13,0±0,4	18,0±0,2	20,0±0,3
Микробиологические исследования (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	18,0±0,3	18,0±0,3	10,0±0,3		20,0±0,2		13,0±0,2		25,0±0,3	18,0±0,3*	10,0±0,3
Содержание наночастиц по методу Фарадея (г)	-	-	0,006± 0,06·10 ⁻²		0,0295± 0,06·10 ⁻²		0,335± 0,67·10 ⁻²		0,002± 0,07·10 ⁻²	0,02± 0,18·10 ⁻²	0,29± 1,08·10 ⁻²
Содержание новокаина (г)	1,45±0,1	6,977± 0,12·10 ⁻³	6,676±0,13		7,014±0,12		6,805±0,08		6,916±0,09	6,681±0,13	6,756±0,10
Содержание йода (г)	0,303 г ± 0,03	0,9851± 7,85·10 ⁻³	0,9762± 5,02·10 ⁻³		0,9906± 4,61·10 ⁻³		0,9835± 3,29·10 ⁻³		0,9904± 4,33·10 ⁻³	0,9818± 3,13·10 ⁻³	0,9906± 2,31·10 ⁻³
Качественные реакции (ПВП)***	+	+	+		+		+		+	+	+
Качественные реакции (новокаин)**	+	+	+		+		+		+	+	+
Качественные реакции (йод)*	+	+	+		+		+		+	+	+
pH	3,35±0,01	3,19±0,01	3,36±0,01		3,60±0,01		3,72±0,01		3,07 ±0,01	3,13±0,01	3,75±0,01
Растворимость (растворитель - вода)	-	Легко растворим	Легко растворим		Легко растворим		Легко растворим		Легко растворим	Легко растворим	Легко растворим
Описание	Раствор темно-коричневого цвета	Мазь коричневого цвета с красноватым отливом	Мазь коричневого цвета с красноватым отливом		Мазь темно-коричневого цвета с красноватым отливом		Мазь темно-коричневого цвета		Мазь темно-коричневого цвета	Мазь черного цвета	Мазь черного цвета
Критерий	Раствор для наружного применения	Мазь «Новокомб-50%»	Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 0,01% Fe ₃ O ₄		Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 0,1% Fe ₃ O ₄		Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 1% Fe ₃ O ₄		Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 0,01% Fe@C	Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 0,1% Fe@C	Мазь «Новокомб-50%» + Нанокомпонента 1% Fe@C

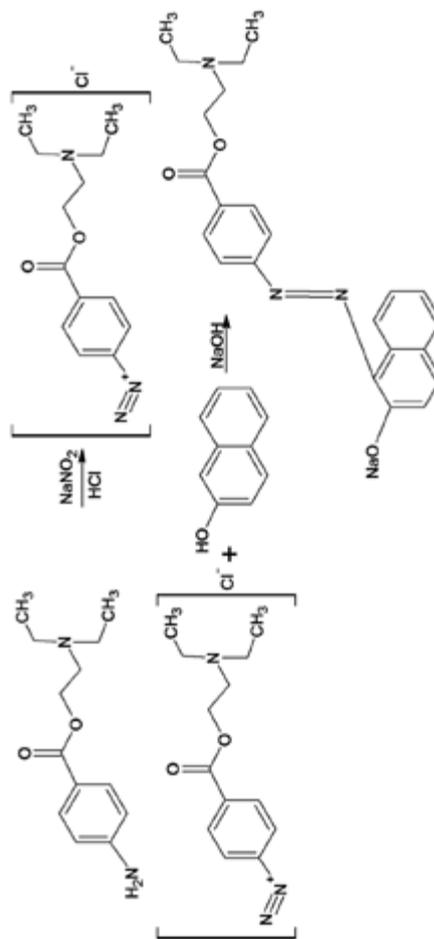
Окончание табл. 6

Срок годности	2 года
Скорость ранозаживления ожоговой раны у крыс (в днях)	
Микробиологические исследования (<i>Corynebacterium</i>)	
Микробиологические исследования (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
Микробиологические исследования (<i>Staphylococcus aureus</i>)	
Микробиологические исследования (<i>Proteus mirabilis</i>)	
Микробиологические исследования (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	
Содержание наночастиц по методу Фарадея (г)	-
Содержание новокаина (г)	$6,584 \cdot 10^{-2} \pm 5,62 \cdot 10^{-3}$
Содержание йода (г)	$6,345 \cdot 10^{-6} \pm 1,25 \cdot 10^{-2}$
Качественные реакции (ПВП)***	+
Качественные реакции (новокаин)**	+
Качественные реакции (йод)*	+
pH	-
Растворимость (растворитель – вода)	-
Описание	Коричневый
Критерий	Салфетки для наружного применения

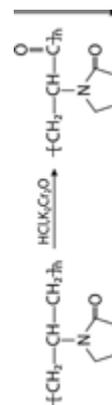
Примечание: *Реакция обнаружения йода с натрия тиосульфатом (появление светло-желтой неизменяющейся окраски)



**Реакция обнаружения новокаина (красно-оранжевая окраска).



***Реакция обнаружения ПВП (оранжево-желтый осадок).



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

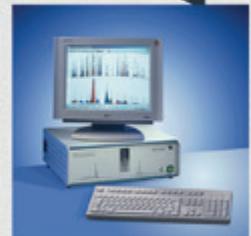
ПО GINA Star контролирует систему ВЭЖХ в целом, что позволяет проводить контроль качества РФП в соответствии с требованиями GMP и GLP

- детектирование низко- и высокоэнергетического бета-, гамма- и черенковского излучения

- фотозлектронные умножители с фотокатодом 2"-ого диаметра гарантируют высокую чувствительность и низкий уровень фона



Проточный ВЭЖХ-детектор бета-радиоактивности RAMONA Star для проверки радиохимической чистоты



RAMONA Star может быть укомплектована различными ячейками:

- **трубчатой** для определения бета-минус нуклидов (ЗН 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 (^{14}C)
- **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 столлик 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

УДК 661.163.2; 661.166; 547-32; 543.544.53

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ ХЛОРИРОВАНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕЛЬМИНТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

В. Г. Дударев^{1*}, М. Р. Кузьминых¹, Г. М. Алексеева¹

Резюме. С помощью тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии исследовано изменение состава реакционной массы в процессе хлорирования салициловой кислоты тремя методами: молекулярным хлором в уксусной кислоте, гипохлоритом натрия в водно-щелочном растворе и окислительным хлорированием смесью перекиси водорода и соляной кислоты в среде уксусной кислоты. Показано, что наиболее полное превращение салициловой кислоты в 3,5-дихлорсалициловую кислоту наблюдается в реакции с гипохлоритом натрия, а наименее полное – в реакции окислительного хлорирования. Установлено, что побочная реакция ипсо-замещения карбоксильной группы с образованием 2,4,6-трихлорфенола в наибольшей степени происходит при хлорировании салициловой кислоты газообразным хлором в среде уксусной кислоты и гипохлоритом натрия в водно-щелочной среде. Установлено, что перекристаллизация технической 3,5-дихлорсалициловой кислоты из 50%-го водного 2-пропанола наиболее эффективно позволяет удалить примесь 2,4,6-трихлорфенола, а в меньшей степени – примесь монохлорсалициловых кислот.

Ключевые слова: 3,5-дихлорсалициловая кислота, антигельминтные лекарственные субстанции, хлор, гипохлорит натрия, пероксид водорода, соляная кислота.

A COMPARATIVE STUDY OF METHODS OF THE SALICYLIC ACID CHLORINATION FOR FURTHER PRODUCTION OF ANTIHELMINTHIC DRUGS

V. G. Dudarev^{1*}, M. R. Kuzminykh¹, G. M. Alekseeva¹

Abstract. With the help of thin-layer and high-performance liquid chromatography, the change in the composition of the reaction mass during the chlorination of salicylic acid was studied by three methods: molecular chlorine in acetic acid, sodium hypochlorite in an aqueous alkaline solution and oxidative chlorination with a mixture of hydrogen peroxide and hydrochloric acid in an acetic acid environment. It is shown that the most complete transformation of salicylic acid into 3,5-dichlorosalicylic acid is observed in the reaction with sodium hypochlorite, and the least complete – in the reaction of oxidative chlorination. It was found that the adverse reaction of the ipso-replacement of the carboxyl group with the formation of 2,4,6-trichlorophenol to the greatest extent occurs in chlorination of salicylic acid with gaseous chlorine in the acetic acid and with sodium hypochlorite in the aqueous alkaline medium. It is established that recrystallization technical 3,5-dichlorosalicylic acid of 50% aqueous 2-propanol to most effectively allows you to remove the admixture of 2,4,6-trichlorophenol, and to a lesser extent, admixture chlorosalicylic acids.

Keywords: 3,5-dichlorosalicylic acid, anthelmintic drug substances, chlorine, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, hydrochloric acid.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

* адресат для переписки:

E-mail: vladimir.dudarev@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

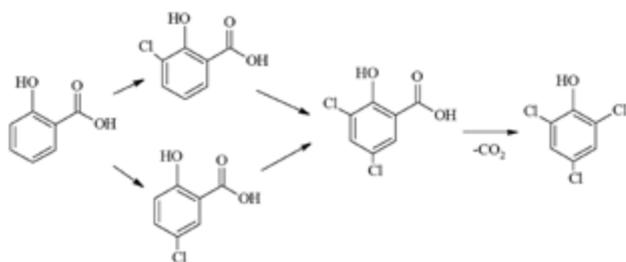
Хлорзамещённые салициловые кислоты нашли применение в качестве промежуточных продуктов получения избирательно действующих гербицидов, фунгицидов, красителей, компонентов хемолюминисцентных композиций, ингибиторов ферментов и лекарственных веществ [1, 2]. В частности, некоторые анилиды 3,5-дихлорсалициловой кислоты зарекомендовали себя как малотоксичные и эффективные средства для профилактики и лечения гельминтозов животных [3–7].

Традиционно 3,5-дихлорсалициловую кислоту (ДХСК) получают хлорированием салициловой кислоты (СК) молекулярным хлором, чаще всего в среде уксусной кислоты [8]. Следует отметить, что молекулярный хлор обладает сильным корродирующим действием на аппаратуру, ядовит и неудобен при дозировании. Поэтому представляют интерес альтернативные методы хлорирования салициловой кислоты, в которых непосредственный хлорирующий агент (молекулярный хлор, хлорноватистая кислота) образуется *in situ* из хлористого водорода и окислителя. Такими окислителями могут выступать перок-

сид водорода, N-хлорсукцинимид [9, 10], перйодат натрия [1] или хлорат натрия [11, 12]. Наиболее доступными из перечисленных окислителей являются хлорат натрия и растворы пероксида водорода, поскольку они производятся в крупных масштабах. Использование реагента $\text{NaClO}_3/\text{HCl}$ для хлорирования салициловой кислоты описано в нескольких, в том числе современных, публикациях. Процесс хлорирования с помощью реагента $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ использован для получения 5-хлорсалициловой кислоты [13], а работы по получению ДХСК этим методом относятся к первой трети XX века и представляют лишь исторический интерес, а сам метод нуждается в усовершенствовании.

Также известен способ хлорирования салициловой кислоты гипохлоритом натрия [2], однако он мало изучен с технологической точки зрения. К достоинствам гипохлорита натрия можно отнести его широкое использование для обеззараживания воды и отбеливания тканей, сравнительно небольшую стоимость и доступность, к недостаткам – производство в виде растворов малой концентрации и их нестабильность при хранении.

Известно, что реакция хлорирования СК протекает ступенчато с образованием вначале 3- и 5-хлорсалициловых кислот (3-ХСК и 5-ХСК), затем ДХСК.



Существенным недостатком процесса является побочная реакция ипсо-замещения карбоксильной группы атомом хлора с образованием 2,4,6-трихлорфенола (ТХФ). Поэтому неочищенный целевой продукт (ДХСК) может содержать примеси как 3-ХСК и 5-ХСК, не полностью вступивших в реакцию хлорирования, так и ТХФ, что может повлиять на особенности очистки.

Количественная информация о превращениях СК в продукты хлорирования нами была найдена в литературе только для реакций с хлором и гипохлоритом натрия в водных растворах [14–16]. Однако и эти данные имеют малый практический интерес для настоящего исследования в силу недостаточной степени конверсии СК, а информация об эффективности очистки ДХСК нами не была найдена.

Поэтому целью работы были поиск метода хлорирования СК, обеспечивающего максимальную селективность её превращения в ДХСК при минимальном образовании побочных продуктов, в частности ТХФ, а также оценка эффективности очистки целевого продукта кристаллизацией.

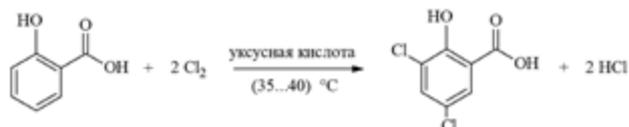
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали раствор технического гипохлорита натрия марки А («ЛенРеактив», концентрация активного хлора 100 г/дм^3 , определение точной концентрации проводили по ГОСТ 11086-76), раствор перекиси водорода медицинской («ЛенРеактив», 40%, определение точной концентрации проводили по ГОСТ 177-88), салициловую кислоту («НеваРеактив», >99%), салицилат натрия («НеваРеактив», >99,5%), ледяную уксусную кислоту («Вектон», >99,8%), соляную кислоту («Вектон», 35–38%), перманганат калия («Вектон», >99%). 3-хлорсалициловую кислоту, 5-хлорсалициловую кислоту, 3,5-дихлорсалициловую кислоту и 2,4,6-трихлорфенол получали по известным методикам.

Хлорирование СК проводили тремя методами: молекулярным хлором в среде уксусной кислоты, окислительным хлорированием смесью перекиси водорода и соляной кислоты и гипохлоритом натрия в водно-щелочном растворе. Опыты по хлорированию проводили по 3 раза.

1. Хлорирование салициловой кислоты газообразным хлором в среде уксусной кислоты.

Синтез осуществляли по схеме:



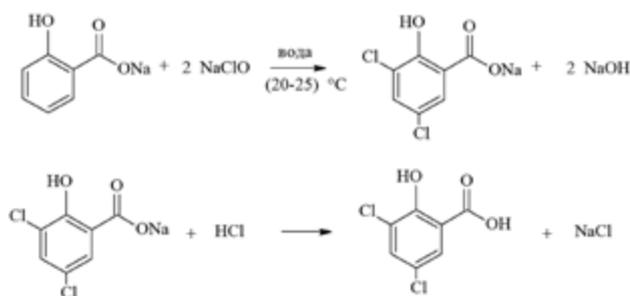
Хлор получали, прикапывая 87 мл (1,0 моль) концентрированной соляной кислоты к 15,8 г (0,1 моль) перманганата калия по уравнению $16\text{HCl} + 2\text{KMnO}_4 = 5\text{Cl}_2 + 2\text{MnCl}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$, пропускали через склянки с водой и концентрированной серной кислотой. Метод хлорирования [8] использовали с некоторыми модификациями (уменьшено количество растворителя). В трёхгорлой круглодонной колбе объёмом 100 мл суспендировали 13,8 г (0,1 моль) СК в 60 мл ледяной уксусной кислоты и пропускали газообразный хлор в течение 5 ч, поддерживая температуру в реакционной массе в интервале 35–40 °С. После окончания барботирования хлора выдержку продолжали при указанной температуре ещё в течение 3 ч.

Для определения степени превращения СК в продукты хлорирования анализировали образцы реакционной массы с помощью ТСХ и ВЭЖХ. Отбирали пробы объёмом 1 мл через 2 и 5 ч после начала барботирования хлора, а также спустя 1 и 3 ч после его окончания. К пробам прибавляли раствор 0,38 г (0,002 моль) метабисульфита натрия в 5 мл воды для удаления избытка хлора и остановки реакции хлорирования, затем растворители удаляли под вакуумом при комнатной температуре.

Осадок целевого продукта, полученный в результате хлорирования салициловой кислоты, отфильтровывали, промывали 20 мл ледяной уксусной кислоты, затем 100 мл дистиллированной воды, высушивали при 100 °С до постоянной массы и перекристаллизовывали из кипящего 50%-го водного 2-пропанола (5 мл на 1 г осадка). Проводили анализ образцов полученного осадка методами ТСХ и ВЭЖХ до и после перекристаллизации и рассчитывали массовую долю основных компонентов.

2. Хлорирование салицилата натрия гипохлоритом натрия в водно-щелочной среде.

Процесс проводили по схеме:



К раствору 16,1 г (0,1 моль) салицилата натрия в 50 мл воды, помещённому в стакан, в течение 2 ч при перемешивании приливали 178 мл (0,25 моль) водного раствора гипохлорита натрия, поддерживая температуру реакционной массы в интервале 20–25 °С. После слива всего объёма раствора гипохлорита натрия выдержку продолжали ещё 6 ч. Отбор проб реакционной массы объёмом 1 мл осуществлялся через 1 ч после начала синтеза (слив половины объёма раствора гипохлорита), через 2 ч после начала синтеза (окончание слива раствора гипохлорита), через 3 ч после начала синтеза (часовая выдержка), через 6 и 8 ч после начала синтеза (4- и 6-часовая выдержка). Пробы обрабатывали метабисульфитом натрия, как указано в п. 1, подкисляли до pH 0,5 соляной кислотой, затем воду удаляли под вакуумом.

Реакционную массу, полученную в результате хлорирования, подкисляли до pH 0,5 соляной кислотой, осадок отфильтровали и тщательно промывали дистиллированной водой, затем высушивали при 100 °С. Перекристаллизацию технического продукта и отбор проб для анализа методами ТСХ и ВЭЖХ осуществляли, как указано в п. 1.

3. Окислительное хлорирование салициловой кислоты смесью перекись водорода / соляная кислота в среде уксусной кислоты.

Процесс проводили по уравнению:



В трёхгорлую круглодонную колбу объёмом 250 мл, снабжённую механической мешалкой, загружали 13,8 г (0,1 моль) салициловой кислоты, 43 мл (0,5 моль) концентрированной соляной кислоты и 60 мл уксусной кислоты и при перемешивании в течение 6 ч прикапывали 18,4 мл 40%-го раствора перекиси водорода (0,25 моль), поддерживая температуру реакционной массы в пределах 35–40 °С. По окончании слива раствора H₂O₂ выдержку продолжали в тех же условиях ещё 2 ч.

Отбор проб объёмом 1 мл осуществлялся несколько раз: через 2 ч после начала синтеза (слив около 2/3 объёма пероксида водорода), через 6 ч после начала синтеза (окончание слива раствора пероксида), через 1 и 2 ч после окончания слива пероксида. Пробы реакционной массы обрабатывали, как указано в п. 1., и подвергали анализу методами ТСХ и ВЭЖХ.

Выделившийся в результате реакции хлорирования осадок отфильтровывали, промывали 150 мл дистиллированной воды и высушивали при 100 °С. Перекристаллизацию технического продукта и отбор проб для анализа методами ТСХ и ВЭЖХ осуществляли, как указано в п. 1.

Хроматографический анализ продуктов реакции хлорирования салициловой кислоты. Тонкослойную хроматографию подготовленных образцов реакционной массы, а также выделенной ДХСК до и после перекристаллизации проводили на пластине Merck TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Германия) в смеси растворителей этилацетат : муравьиная кислота (100:1) и толуол : уксусная кислота (100:1) с проявкой в УФ-свете при длине волны 254 нм. Пробы растворяли в смеси воды и этилацетата и наносили на пластины этилацетатный слой. Для хроматографии использовали растворы стандартных образцов целевого продукта (ДХСК) и возможных примесей: СК, 3-ХСК, 5-ХСК и ТХФ. Стандартные образцы получали перекристаллизацией товарных веществ из 50%-го водного 2-пропанола до получения хроматографически однородных продуктов.

Анализу методом ВЭЖХ подвергали те же объекты, что и методом ТСХ. Для приготовления анализируемой пробы точную навеску образца массой около 50 мг помещали в мерную колбу объёмом 50 мл, добавляли 25 мл растворителя (смесь воды и ацетонитрила в объёмном соотношении 1:1), встряхивали колбу до растворения образца, после чего объём раствора доводили до метки тем же растворителем. Из полученного раствора с концентрацией анализируемого образца 1 мг/мл методом последовательного разбавления получили испытуемые растворы веществ концентраций от 0,01 мг/мл до 0,5 мг/мл. Полученные растворы фильтровали через мембранный фильтр Millipore Fluoropore FGLP04700 из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,22 мкм. Регистрацию хроматограмм (время хроматографирования – 10 мин, объём вкола – 2 мкл) проводили на приборе «Милихром А-02» с колонкой ProntoSIL 120-5-C18 AQ 75 мм × 2 мм × 5 мкм.

В качестве подвижной фазы использовали: ацетонитрил : 0,1 М раствор ортофосфорной кислоты с pH=2,1 (50:50), скорость элюирования составляла 0,1 мл/мин, температура колонки – 40 °С, детектирование проводили при 210 нм. Расчёт количественного содержания анализируемых веществ проводили методом внешнего стандарта. Массовую долю компонентов рассчитывали относительно суммы СК+ДХСК+МХСК+ТХФ. Поскольку 3-ХСК и 5-ХСК не разделялись при хроматографировании, рассчитывали их суммарную долю (обозначение МХСК).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Хлорирование салициловой кислоты газообразным хлором в среде уксусной кислоты.

С помощью ВЭЖХ в реакционной массе, помимо целевого продукта, обнаружены заметные количества не вступивших в реакцию МХСК (почти исключительно 5-ХСК) и побочного продукта ТХФ. Для нахождения оптимального количества хлора и необходимого времени выдержки была построена зависимость состава реакционной массы от времени синтеза (рисунок 1).

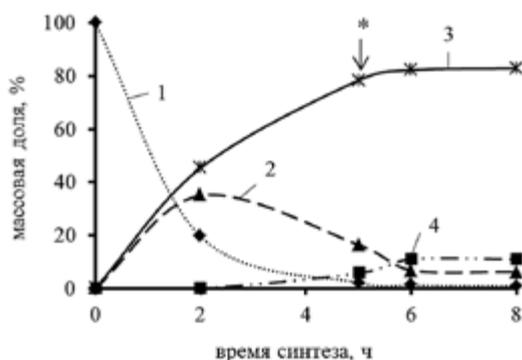


Рисунок 1. График зависимости состава реакционной массы, полученной при хлорировании салициловой кислоты газообразным хлором при 35-40 °С, от времени синтеза (1 – салициловая кислота, 2 – сумма 3- и 5-хлорсалициловых кислот, 3 – 3,5-дихлорсалициловая кислота, 4 – 2,4,6-трихлорфенол).

* время окончания барботирования хлора.

Массовая доля веществ рассчитана относительно суммы СК+МХСК+ДХСК+ТХФ

Следует отметить, что изменение состава реакционной массы происходит во время барботирования хлора и в течение 1 ч после его окончания, и дальнейшая выдержка нецелесообразна. Так, к концу барботирования 25%-го избытка хлора доля ДХСК относительно других продуктов хлорирования составляет 78%, а спустя 1 ч выдержки при перемешивании увеличивается до 83%. Несмотря на то что к концу выдержки в реакционной массе сохраняется около 6% не вступившей в реакцию МХСК, образуется значительная (10–11%) примесь ТХФ.

Одной из задач работы была оценка эффективности очистки образцов ДХСК. Так, в результате фильтрации и промывки выделившегося осадка ДХСК практически весь ТХФ удаляется из осадка (таблица 1). Очистка от МХСК происходит значительно хуже: при фильтрации удаляется только 15–16% их исходного количества. В результате перекристаллизации образцов ДХСК из 50%-го водного 2-пропанола доля МХСК уменьшается примерно на 22%, в итоге содержание основного вещества достигает 95–96%.

Таблица 1.

Результаты количественного анализа образцов реакционной массы, отфильтрованных и перекристаллизованных осадков, полученных хлорированием салициловой кислоты различными методами

Метод хлорирования	Объект анализа	Массовая доля, % ^{1), 3)}			
		СК	МХСК	ДХСК	ТХФ
молекулярный хлор	реакционная масса	– ²⁾	6,1	83,0	10,9
	отфильтрованный осадок	–	5,9	94,1	–
	осадок после перекристаллизации	–	4,6	95,4	–
гипохлорит натрия	реакционная масса	1,3	3,6	84,6	10,5
	отфильтрованный осадок	0,9	3,1	92,3	3,7
	осадок после перекристаллизации	–	1,5	98,2	–
окислительное хлорирование (H ₂ O ₂ +HCl)	реакционная масса	1,9	16,0	81,1	–
	отфильтрованный осадок	1,2	15,1	83,7	–
	осадок после перекристаллизации	–	8,1	91,9	–

Примечания:

- 1) Относительная погрешность определения веществ методом ВЭЖХ находилась в пределах (0,1...0,2) %;
- 2) Прочерк означает, что содержание компонента ниже предела обнаружения;
- 3) Массовая доля веществ рассчитана относительно суммы СК+МХСК+ДХСК+ТХФ.

Выход неочищенного целевого продукта ДХСК, полученного методом хлорирования хлором, составляет 59–64%, а выход на стадии перекристаллизации – 80–84% в пересчёте на 100% вещество.

Полученные нами данные о селективности реакции и чистоте целевого продукта не подтверждают данные работы [8] о том, что хлорирование СК до ДХСК хлором в среде уксусной кислоты протекает с выходом 94%, а содержание основного вещества даже без очистки составляет не менее 99%.

2. Хлорирование салицилата натрия гипохлоритом натрия в водно-щелочной среде.

С помощью ВЭЖХ в реакционной массе, помимо ДХСК, обнаружены заметные количества не вступивших в реакцию МХСК (с преобладанием 3-ХСК) и побочного продукта ТХФ. Для нахождения оптимального количества гипохлорита натрия и необходимого времени выдержки была построена зависимость состава реакционной массы от времени синтеза (рисунок 2).

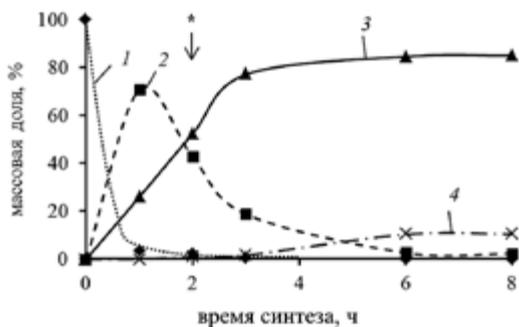


Рисунок 2. График зависимости состава реакционной массы, полученной при хлорировании салициловой кислоты гипохлоритом натрия в водной среде, от времени синтеза (1 – салициловая кислота, 2 – сумма 3- и 5-хлорсалициловых кислот, 3 – 3,5-дихлорсалициловая кислота, 4 – 2,4,6-трихлорфенол).

* время окончания слива гипохлорита натрия.

Массовая доля веществ рассчитана относительно суммы СК+МХСК+ДХСК+ТХФ

Можно отметить, что 6-часовая выдержка при 20...25 °С после окончания слива гипохлорита натрия с 25%-м избытком позволяет более полно превратить СК в ДХСК, чем в методе с использованием газообразного хлора, и доля МХСК относительно других продуктов хлорирования СК в реакционной массе не превышает 4%. При этом доля побочного продукта ТХФ, образующегося в процессе хлорирования (10–11%), сопоставима с методом, использующим газообразный хлор.

После подкисления и фильтрации реакционной массы, промывки и сушки осадка ДХСК при 100 °С следы не вступившей в реакцию СК и более половины ТХФ удаляются из осадка (таблица 1). Очистка осадка от МХСК в процессе фильтрации проходит малоэффективно, как и в методе с применением хлора в уксусной кислоте. Дальнейшая перекристаллизация продукта из водного 2-пропанола позволяет полностью избавиться от ТХФ и уменьшает количество МХСК примерно наполовину. В итоге в образцах ДХСК может быть достигнута доля основного вещества выше, чем в методе с использованием хлора (таблица 1).

Выход неочищенного целевого продукта, полученного данным методом, составляет 61–68%, а выход на стадии перекристаллизации – 83–85% в пересчёте на 100% вещество.

3. Окислительное хлорирование салициловой кислоты смесью перекись водорода / соляная кислота в среде уксусной кислоты при 35–40 °С.

Наши предварительные исследования реакции окислительного хлорирования салициловой кислоты системой H_2O_2/HCl по методике патента [13] с помощью ТСХ показали, что получить ДХСК в водной среде с высоким выходом невозможно. Это можно объяснить как дезактивирующим влиянием атома хлора на реакцию хлорирования, так и малой растворимостью

3-ХСК и 5-ХСК в воде. Опыты с окислительным хлорированием салициловой кислоты с добавкой уксусной кислоты дали положительные результаты.

С помощью ВЭЖХ в реакционной массе обнаружены, помимо ДХСК, следы 3-ХСК и заметные количества 5-ХСК. Зависимость состава реакционной массы от времени окислительного хлорирования салициловой кислоты системой H_2O_2/HCl в уксусной кислоте, найденная с помощью ВЭЖХ, представлена на рисунке 3.

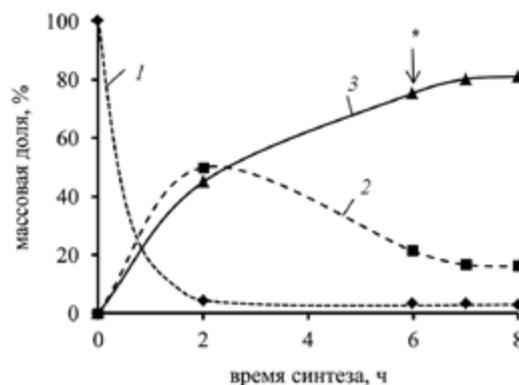


Рисунок 3. График зависимости состава реакционной массы, полученной при окислительном хлорировании салициловой кислоты системой перекись водорода / соляная кислота, от времени синтеза (1 – салициловая кислота, 2 – сумма 3- и 5-хлорсалициловых кислот, 3 – 3,5-дихлорсалициловая кислота).

* время окончания слива пероксида водорода.

Массовая доля веществ рассчитана относительно суммы СК+МХСК+ДХСК+ТХФ

Примечательно, что хлорирование СК данным методом позволяет избежать образования заметного (выше предела обнаружения ВЭЖХ) количества ТХФ. Это можно объяснить малой растворимостью ДХСК в реакционной среде в условиях реакции. К недостатку данного метода можно отнести сравнительно высокую долю в реакционной массе (до 16%) непрореагировавших МХСК (по данным ТСХ, в основном 5-ХСК), несмотря на то что избыток загруженного пероксида водорода составил 25% от теории, а соляной кислоты – 150%. Выдержка реакционной массы более 1 ч после окончания слива пероксида водорода не приводит к заметным изменениям в её составе.

Фильтрация реакционной массы с промывкой осадка уменьшает долю МХСК только незначительно, а перекристаллизация позволяет удалить около половины этой примеси (таблица 1). При использовании метода окислительного хлорирования доля МХСК в целевом продукте наиболее высокая, что можно объяснить в том числе трудностью очистки от этой примеси.

Выход неочищенной ДХСК по данному методу составляет 67–72%, а выход на перекристаллизации – 78–81% в пересчёте на основное вещество.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнении трёх использованных нами хлорирующих реагентов, взятых с избытком в 25%, наибольшая селективность превращения салициловой кислоты в 3,5-дихлорсалициловую кислоту достигается при использовании в качестве реагента гипохлорита натрия. Несмотря на то что около 10% салициловой кислоты при этом превращается в 2,4,6-трихлорфенол, перекристаллизация из 50%-го водного 2-пропанола позволяет практически полностью удалить этот побочный продукт. В итоге хлорированием салициловой кислоты гипохлоритом натрия возможно достичь наибольшей доли основного вещества в целевом продукте.

Реакция салициловой кислоты с 25% избытком хлора в уксусной кислоте также сопровождается образованием около 10% 2,4,6-трихлорфенола, однако доля непрореагировавших монохлорсалициловых кислот в реакционной массе несколько выше, чем в методе с гипохлоритом натрия.

Менее всего салициловая кислота превращается в 2,4,6-трихлорфенол при её обработке системой $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ (25% избыток пероксида водорода и 150% избыток соляной кислоты) в среде уксусной кислоты при 35–40 °С. Однако при использовании данного метода доля монохлорсалициловых кислот в реакционной массе и целевом продукте наиболее высокая, что можно объяснить в том числе трудностью очистки от этой примеси.

Таким образом, исследована возможность замены неудобного в обращении хлора для хлорирования салициловой кислоты гипохлоритом натрия либо смесью соляной кислоты и перекиси водорода в среде уксусной кислоты. Полученные образцы 3,5-дихлорсалициловой кислоты содержат от 2 до 9% примесей в зависимости от метода, в основном это монохлорсалициловые кислоты. В дальнейшем планируется определить влияние содержания примесей в 3,5-дихлорсалициловой кислоте на качество конечных продуктов – антигельминтных субстанций салициланилидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Mahajan T., Kumar L., Dwivedi K., Agarwal D. D. Sodium Lauryl Sulfate-Catalyzed Oxidative Chlorination of Aromatic Compounds // *Synthetic Communications*. 2012. V. 42. P. 3655–3663.
- Solakyildirim K., Bulloch D. N., Larive C. K. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of halogenated transformation products of pharmaceuticals and related environmental contaminants // *Magn. Reson. Chem.* 2014. V. 52. P. 310–317.
- Swan G. E. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals // *J. S. Afr. Vet. Ass.* 1999. V. 70. Iss. 2. P. 61–70.
- Патент РФ № 2476424, МПК А 61К 31/609, А 61 Р 33/10, С 07 С 235/66. N-(3-хлор-4-пропилоксибензил)-3,5-дихлорсалициламид, обладающий антигельминтной активностью / Бурякина А. В., Гицу Г. А., Малахова А. Ю., Михайлицын Ф. С., Сафарова А. Я., Севбо Д. П., Трусов С. Н.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации. – Заявл. 22.12.2011; опубл. 10.05.2013. 4 с.
- Михайлицын Ф. С., Севбо Д. П., Трусов С. Н. и др. Получение и противогельминтная активность соединения MST-25 // *Мед. паразитол. и паразитарные болезни*. 2011. № 2. С. 41–42. [Mikhailitsyn F. S., Sevbo D. P., Trusov S. N. i dr. Poluchenie i protivogimenolepidoznaya aktivnost' soedineniya MST-25 // *Med. parazitolog. i parazitarnye bolezni*. [Obtaining and antihymenolepidic activity of compound MST-25 // *Med. parasitol. and parasitic diseases*.] 2011. № 2. S. 41–42.]
- Патент РФ № 2481327, МПК C07C235/44, A61P33/10, A61K31/609. N-(3,4-дихлорфенил)-2-(ацетилокси)-3,5-дихлорбензамид, обладающий антигельминтной активностью / Михайлицын Ф. С., Архипов И. А., Севбо Д. П., Трусов С. Н., Мусаев М. Б., Козлов С. А., Архипова Д. Р., Садов К. М., Белова Е. Е., Гицу Г. А.; заявитель и патентообладатель ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии имени К. И. Скрябина. – Заявл. 27.12.2011; опубл. 10.05.2013. 3 с.
- Августинович Д. Ф., Вишневская Г. Б., Пирожкова Д. С. и др. Влияние N-(4-метил-3-хлорфенил)-2-ацетокси-3,5-дихлорбензамида на половозрелых и ювенильных особей *O. felinus* в условиях *in vitro* и *in vivo* // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2017. Т. 37. № 3. С. 17–26. [Avgustinovich D. F., Vishnivetskaya G. B., Pirozhkova D. S. i dr. Vliyanie N-(4-metil-3-khlorfenil)-2-atsetoksi-3,5-dikhlorbenzamida na polovozrelykh i yuvenilnykh osobei *O. felinus* v usloviyakh *in vitro* i *in vivo* // *Effect of N-(4-methyl-3-chlorophenyl)-2-acetoxy-3,5-dichlorobenzamide on sexually mature and juvenile *O. felinus* in vitro and in vivo*.] // *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal*. 2017. T. 37. № 3. S. 17–26.]
- Пилугин В. С., Сапожников Ю. Е., Сапожникова Н. А. Ацильные производные 2-аминобензимидазола и их фунгицидная активность // *Ж. общей химии*. 2004. Т. 74. Вып. 5. С. 804–810. [Pilyugin V. S., Sapozhnikov Yu. E., Sapozhnikova N. A. Atsil'nye proizvodnye 2-aminobenzimidazola i ikh fungitsidnaya aktivnost' [Acy derivatives of 2-aminobenzimidazole and their fungicidal activity.] *Zh. obshchei khimii*. 2004. T. 74. Vyp. 5. S. 804–810.]
- Mahajan T., Kumar L., Dwivedi K., Agarwal D. D. Efficient and facile chlorination of industrially-important aromatic compounds using NaCl/p-TsOH/NCS in aqueous media // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012. V. 51. P. 3881–3886.
- Sharma S. K. Chlorination of aromatic compounds in aqueous media using N-chlorosuccinimide // *Res. J. Chem. Sci.* 2015. V. 5. Iss. 12. P. 54–73.
- Eckstein Z. Porownanie metod otrzymywania kwasu 3,6-dwuchloro-2-metoksybenzoesowego (dikamby) // *Przemysl chemiczny*. 1979. V. 58. P. 533–536.
- Sharma S. K., Agarwal D. D. Oxidative Chlorination of Aromatic Compounds in aqueous media // *Int. J. Sci. Res. Publ.* 2014. V. 4. Iss. 7. P. 1–18.
- Патент РФ № 2053217, МПК C07C65/05, C07C51/363. Способ получения 5-хлорсалициловой кислоты / Красюк И. И., Литвин Б. Л.; заявитель и патентообладатель Ивано-Франковская фирма «Барва». – Заявл. 12.11.1990; опубл. 27.01.1996. 3 с.
- Broadwater M. A., Swanson T. L., Sivey J. D. Comparing the inherent reactivity of often overlooked aqueous chlorinating and brominating agents toward salicylic acid // *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 2018. Advance Article. First published on 04 Jan 2018. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C7EW00491E>.
- Prutz W. A. Reactions of hypochlorous acid with biological substrates are activated catalytically by tertiary amines // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 357. № 2. P. 265–273.
- Quintana J. B., Rodil R., Lopez-Mahia P. et al. Investigating the chlorination of acidic pharmaceuticals and by-product formation aided by an experimental design methodology // *Water Res.* 2010. V. 44. P. 243–255.

УДК 615.07

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Е В МИКРОЭМУЛЬСИОННЫХ КОМПОЗИЦИЯХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С. В. Курсаков^{1,2}, Е. Г. Кузнецова^{1*}, О. М. Курылева¹, Л. А. Саломатина¹, В. И. Севастьянов¹

Резюме. В статье представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения токоферола ацетата (витамина Е) в микроэмульсионных композициях, пригодной для контроля его содержания в образцах трансдермальных терапевтических систем, а также при проведении входного контроля масляных растворов токоферола ацетата, используемых в качестве сырья. Методика основана на извлечении витамина Е из микроэмульсии смесью ацетонитрил – этилацетат (80:20) и последующем анализе методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Основные валидационные характеристики методики соответствуют критериям приемлемости. Интервал концентраций витамина Е в микроэмульсии, в котором доказан приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной прецизионности, составил 0,1–10,0 мг/г. Приведены результаты апробации методики на лабораторных образцах трансдермальных терапевтических систем на основе микроэмульсий.

Ключевые слова: витамин Е, микроэмульсия, обращенно-фазовая ВЭЖХ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF VITAMINE E DETERMINATION IN MICROEMULSION COMPOSITIONS BY HIGH-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

S. V. Kursakov^{1,2}, E. G. Kuznetsova^{1*}, O. M. Kuryleva¹, L. A. Salomatina¹, V. I. Sevastianov¹

Abstract. The results of development and validation of the method of vitamin E determination in microemulsion compositions suitable for its controlling in transdermal delivery systems and also for the incoming control of tocopherol acetate oil solutions presents in the article. The method is based on the vitamin E extraction from the microemulsion by a mixture of acetonitrile – ethyl acetate (80:20) and subsequent analysis by reversed-phase HPLC. The main validation characteristics of the method meet the eligibility criterias. The analytical area of the methodology was from 0.1 to 10.0 mg/g vitamin E concentration. The results of method approbation on transdermal delivery system laboratory samples on microemulsions based are presented.

Keywords: vitamin E, microemulsion, reversed-phase HPLC.

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская д. 1

2 – АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», 123557, Россия, г. Москва, Большой Тишинский пер., д. 43/20, стр. 2

1 – Academician V. I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

2 – ANO «Institute of biomedical research and technology», 43/20, b.2, V. Tishinsky lane, Moscow, 123557, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Микроэмульсии – многокомпонентные жидкие коллоидные системы, характеризующиеся термодинамической устойчивостью и образующиеся самопроизвольно при смешении двух жидкостей с ограниченной взаимной растворимостью в присутствии мицеллообразующих поверхностно-активных веществ [1]. Одной из приоритетных областей применения микроэмульсионных композиций является создание трансдермальных терапевтических систем (ТТС)

фармацевтических и косметических средств. Использование микроэмульсий позволяет повысить скорость диффузии лекарственных веществ через кожу по сравнению с водными растворами этих же лекарственных веществ [2].

Для чрескожной доставки жирорастворимых веществ обычно используют прямые эмульсии «масло в воде» или сложные эмульсии типа «вода – масло – вода»; для водорастворимых – обратные эмульсии «вода в масле» или сложные «масло – вода – масло».

Нами предложены микроэмульсионные композиции различных типов, содержащие витамин Е [2]. Витамин Е, кроме «эффекта разрыхления» кожи, улучшает циркуляцию крови, что повышает биодоступность используемых лекарственных и косметических средств.

Альфа-токоферола ацетат часто применяют в составе различных лекарственных форм и косметических средств в качестве антиоксиданта [3, 4]. Витамин Е входит в состав ТТС «Экселон» с действующим веществом ривастигмином для лечения болезни Альцгеймера, в состав ТТС «Ньюпро» с ротиготином для лечения идиопатической болезни Паркинсона. Также на рынке фармпрепаратов есть назальные капли, в состав которых входит альфа-токоферола ацетат, например, «Эв-касент» и «Пиносол».

Поскольку альфа-токоферола ацетат обладает собственной фармакологической активностью, его содержание в лекарственных формах подлежит нормированию.

В литературе отсутствует единый подход к способам пробоподготовки и определению жирорастворимых витаминов, в том числе витамина Е [5]. Ведущее положение при их определении занимают хроматографические методы анализа, которые постепенно вытесняют спектральные методы [6]. Высокоэффективная жидкостная хроматография с использованием различных детекторов в последние годы получила широкое признание в фармацевтическом анализе для количественного определения витамина Е. За рубежом метод ВЭЖХ применяют в качестве основного метода определения витамина Е в лекарственных формах [7]. В Государственную фармакопею РФ XIII издания включена ОФС.1.2.3.0017.15 «Методы количественного определения витаминов», в которой определение витамина Е в препаратах и масляных растворах рекомендуется проводить методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с детектированием при 292 или 300 нм [8]. Определение жирорастворимых витаминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ перспективно и для решения аналитических задач в производственных условиях [6].

При разработке методов определения жирорастворимых витаминов основной проблемой является сложность их извлечения из исследуемых образцов, связанная с микрокапсулированием витаминов в гидрофильные матрицы [9]. Большинство известных способов определения витамина Е методом ВЭЖХ основано на омылении пробы щелочным раствором с последующей экстракцией аналита гексаном, изооктаном или другими неполярными растворителями [7, 8, 10]. При этом возникают вопросы о полноте извлечения, простоте, надежности и длительности примененных методов, поскольку витамин Е относится к лабильным соединениям [9].

В литературе описаны способы определения витамина Е в фармацевтических препаратах, исключаящие стадию омыления и экстракции [9, 11, 12]. Отсутствуют

сведения об аналогичных методах определения витамина Е в микроэмульсионных композициях. Для определения витамина Е в микроэмульсиях используют метод анализа пищевых продуктов ГОСТ EN 12822-2014, регламентирующий применение нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ после омыления пробы и экстракции аналита [10, 13].

Целью настоящего исследования являлись разработка и валидация методики количественного определения витамина Е в микроэмульсионных композициях, используемых для создания трансдермальных терапевтических систем и косметических препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали ацетонитрил (HPLC-Grade, Panreac, Германия), этилацетат (HPLC-Grade, Panreac, Германия), гексан (HPLC-Grade, Panreac, Германия), метанол (HPLC-Grade, Merck, Германия), дихлорметан (HPLC-Grade, Merck, Германия), ацетон (HPLC-Grade, Merck, Германия), 2-пропанол (HPLC-Grade, Merck, Германия), стандартный образец DL-α-токоферола ацетата (CAS № 7695-91-2, T3376, Sigma-Aldrich, США), масло абрикосовых ядер (CAS 72869-69-3, Desert Whale Jojoba Company Ltd., США); эмульгатор Nikkol Decaglyn PR-20 (CAS 29894-35-7, Nikko Chemicals Co., Ltd, Япония); докюзатнатриевую соль (D4422-50G, Sigma, США).

Оборудование

Исследование проводили на хроматографической системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), снабженной вакуумным дегазатором G1322A, четырехканальным насосом G1311A, высокопроизводительным автосамплером G1367B, термостатом колонок G1316A, ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны G1314B.

Для пробоподготовки применяли весы электронные лабораторные AF-R220CE, точность 0,0001 г (Chinco Denshi Co., Япония), перемешивающее устройство Multi-Vortex V32 (Biosan, Латвия), ванну ультразвуковую ВУ-09-Я-ФП-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия), дозаторы переменного объема «Лен-пипет» 0,5–10, 5–50, 20–200 и 100–1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, Россия).

Объекты исследования

1. Микроэмульсионная композиция «вода в масле» следующего состава:
 - раствор витамина Е в растительном масле – 38,8%;
 - вода – 58,3%;
 - докюзатнатриевая соль – 1,0%;
 - эмульгатор Nikkol Decaglyn PR-20 – 1,9%.

2. Лабораторные образцы трансдермальных терапевтических систем бромокаина [14] и инсулина [15] на основе микроэмульсионной композиции «вода в масле» вышеприведенного состава.

Образцы ТТС бромокаина изготовлены АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», ТТС инсулина – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Приготовление стандартных растворов витамина E

Исходный стандартный раствор витамина E в растительном масле

Около 10 г (точная навеска) стандартного образца DL-α-токоферола ацетата помещали в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл, добавляли около 70 мл растительного масла, обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин при температуре 25 °С, доводили объем раствора маслом до метки и, осторожно взбалтывая, перемешивали.

Рабочий стандартный раствор витамина E в растительном масле

10 мл исходного стандартного раствора витамина E в растительном масле помещали в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки растительным маслом и, осторожно взбалтывая, перемешивали.

Исходный стандартный раствор витамина E в смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20)

Около 200 мг (точная навеска) стандартного образца DL-α-токоферола ацетата помещали в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл, добавляли смесь растворителей ацетонитрил – этилацетат (80:20), обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин при температуре 25 °С, доводили объем раствора той же смесью до метки и, осторожно взбалтывая, перемешивали.

Рабочий стандартный раствор витамина E в смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20)

10 мл исходного стандартного раствора помещали в мерную колбу из темного стекла вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки смесью растворителей ацетонитрил – этилацетат (80:20) и, осторожно взбалтывая, перемешивали.

Содержание витамина E (C_0) в мкг/мл в рабочих стандартных растворах рассчитывали по формуле:

$$C_0 = \frac{a_0 \cdot f_0 \cdot P \cdot 10}{V_0},$$

где a_0 – навеска стандартного образца DL-α-токоферола ацетата, мг; f_0 – фактор разбавления исходного стандартного раствора, равный 0,1; P – процентное содержание основного вещества в стандартном образце DL-α-токоферола ацетата, %; V_0 – объем исходного стандартного раствора, равный 100 мл.

Методика пробоподготовки

Пробу микроэмульсионной композиции массой около 1 г, взвешенную с точностью до 0,1 мг, помещали в колбу Эрленмейера из темного стекла с притертой пробкой вместимостью 25 мл. В пробу вносили стандартный раствор витамина E в масле до достижения необходимой концентрации аналита и перемешивали на устройстве Multi-Vortex V32 в течение 2 мин. В колбу прибавляли 25 мл смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20), перемешивали содержимое и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 15 мин при температуре 25 °С. Отбирали из колбы 1 мл раствора, фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр 0,45 мкм (Millipore) и помещали в вialу для ВЭЖХ.

Условия хроматографического анализа

Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Mediterranean Sea18, 150×4 мм, 5 мкм (Текнокрома, Испания), с предколонкой размером 8×4 мм, заполненной тем же сорбентом. Подвижная фаза: смесь ацетонитрил – этилацетат (80:20), скорость потока – 1,0 мл/мин. Подвижную фазу предварительно фильтровали и дегазировали на устройстве для фильтрации под вакуумом. Температура термостата колонки – 40 °С. Термостатирование образцов отсутствовало.

Детектирование осуществляли при длине волны 284 нм, соответствующей максимуму поглощения DL-α-токоферола ацетата. Время хроматографирования – 12 мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл.

Регистрация и обработка хроматографических данных выполнены с помощью программного обеспечения Chem Station, вер. B.01.03 (Agilent Technologies, США).

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода

Целью данного этапа исследований являлось определение оптимальных условий подготовки образцов микроэмульсионной композиции, а также подбор параметров хроматографического определения вита-

мина Е в полученных пробах. Основными критериями при выборе условий пробоподготовки и хроматографирования служили длительность и простота выполнения, полнота извлечения витамина Е, хроматографическая чистота получаемых проб, качество основных валидационных характеристик.

Извлечение витамина Е из микроэмульсионной композиции проводили с использованием следующих растворителей: гексан, этилацетат, ацетонитрил, метанол, дихлорметан, ацетон, 2-пропанол, а также двойными и тройными смесями этих растворителей в различных пропорциях. Продолжительность обработки пробы варьировали от 5 мин до 4 ч. По результатам экспериментов оптимальным вариантом пробоподготовки признана обработка микроэмульсии смесью ацетонитрил – этилацетат (80:20) в ультразвуковой ванне в течение 15 мин при температуре 25 °С. Степень извлечения витамина Е составила 98,4%.

При выборе условий хроматографического анализа в качестве подвижной фазы были изучены ацетонитрил, метанол, 2-пропанол и их смеси в различных соотношениях. Температуру термостата колонки варьировали в диапазоне от 10 до 50 °С, скорость потока – от 0,5 до 2,0 мл/мин. Наилучшие параметры хроматографического разделения были получены при использовании подвижной фазы состава ацетонитрил – этилацетат (80:20), скорости потока 1,0 мл/мин и температуры термостата колонки 40 °С.

Проверка пригодности хроматографической системы

В соответствии с требованиями ОФС.1.2.3.0017.15 «Методы количественного определения витаминов» [8] хроматографическая система считается пригодной для определения витаминов, если обладает следующими параметрами:

- разрешение между двумя соседними пиками – не менее 1,5;
- факторы асимметрии пиков близки к единице, в предельном случае – не менее 0,8 и не более 2.

Основные параметры хроматографической системы, рассчитанные из хроматограмм стандартного раствора витамина Е, представлены в таблице 1. Разрешение между двумя соседними пиками не рассчитывали, так как на хроматограмме стандартного раствора наблюдается один пик.

Полученные результаты доказывают пригодность хроматографической системы для количественного определения витамина Е.

Валидация методики

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15. «Валидация аналитических методик» [17] по следующим характеристикам: специфич-

ность, линейность, правильность, повторяемость, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность, аналитическая область.

Таблица 1.

Основные параметры хроматографического анализа стандартного раствора витамина Е в смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20) (С=200 мкг/мл, n=6, p<0,95)

Параметр	Значение
Фактор асимметрии пика DL-α-токоферола ацетата (A_s)	0,92
Время удерживания (t), мин	6,70
Коэффициент емкости колонки (k')	3,5
Ширина пика на половине высоты ($t_{w1/2}$), мин	0,17
Число теоретических тарелок, рассчитанное по ширине половины пика (N)	9150

Специфичность

Специфичность валидируемой методики оценивали путем анализа холостого образца микроэмульсионной композиции, образца микроэмульсии с содержанием витамина Е 2,5 мг/г и стандартного раствора витамина Е в смеси ацетонитрил – этилацетат с концентрацией 200 мкг/мл. Соответствующие хроматограммы приведены на рисунках 1–3.

На хроматограммах холостых образцов микроэмульсионной композиции не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания витамина Е. Таким образом, экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет на результат анализа.

Линейность

Для оценки линейности анализировали образцы микроэмульсии, содержащие 0,1; 0,6; 1,3; 2,5; 6,3 и 10,0 мг/г витамина Е. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. По полученным значениям был построен градуировочный график зависимости площади пика от концентрации витамина Е, приведенный на рисунке 4.

Полученные значения площади пиков в диапазоне от 0,1 до 10,0 мг/г линейно зависят от концентрации. Угловой коэффициент b и свободный член a имели значение 184,54 и –3,27 соответственно. Коэффициент корреляции равен 0,9996 (не менее 0,99), что удовлетворяет требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [17].

Правильность

Для оценки правильности методики проводили анализ образцов микроэмульсии, содержащих 0,5; 5,0 и 10,0 мг/г витамина Е.

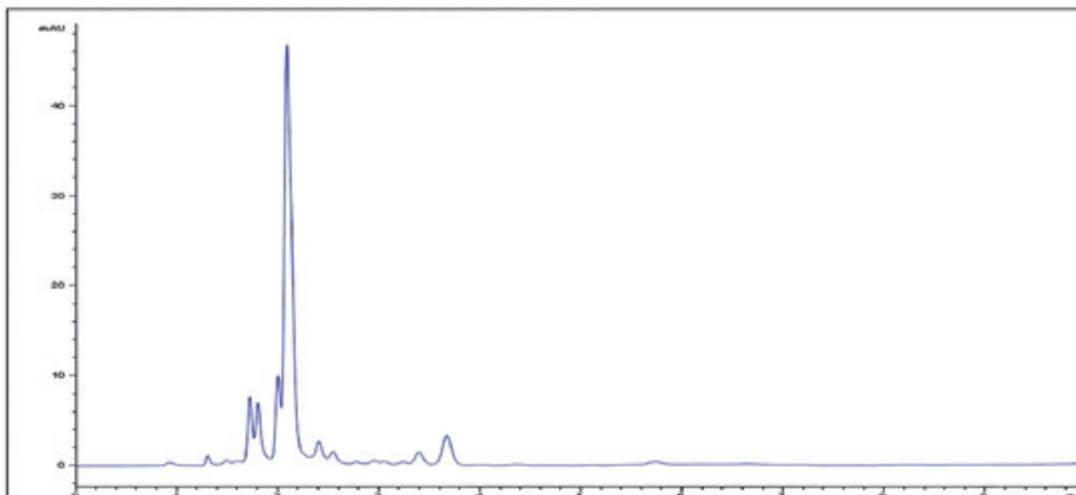


Рисунок 1. Хроматограмма холостого образца микроэмульсионной композиции

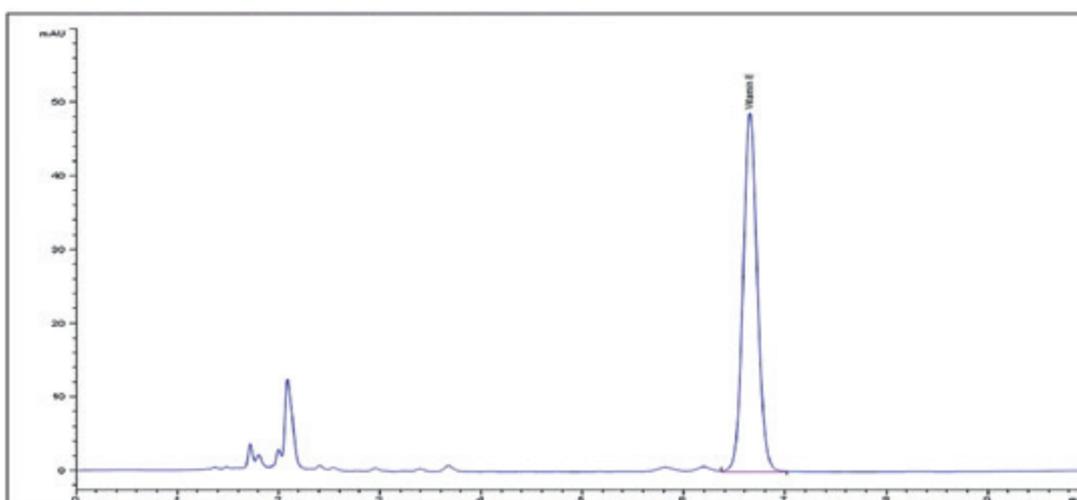


Рисунок 2. Хроматограмма образца микроэмульсионной композиции, содержащего 2,5 мг/г витамина Е

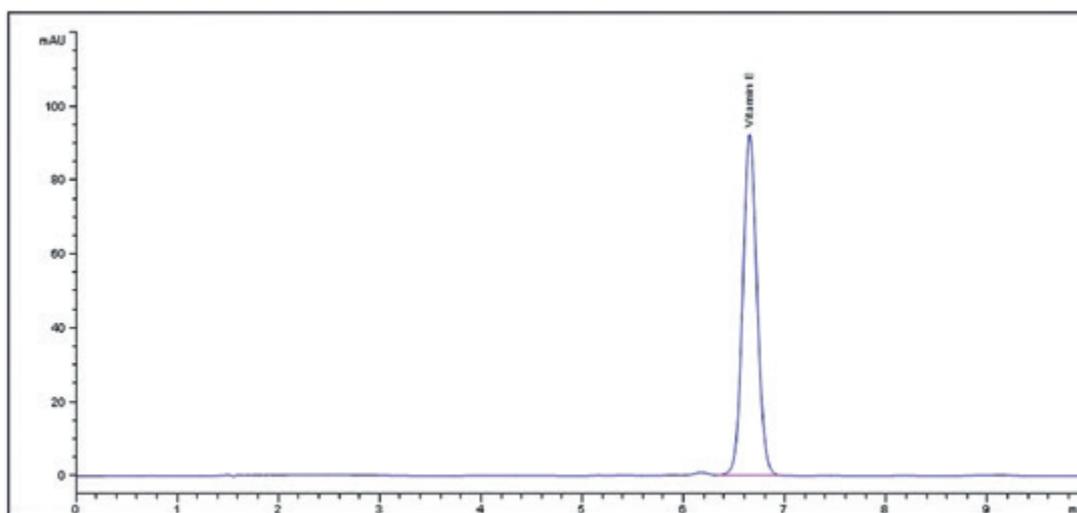


Рисунок 3. Хроматограмма стандартного раствора витамина Е в смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20) с концентрацией 200 мкг/мл

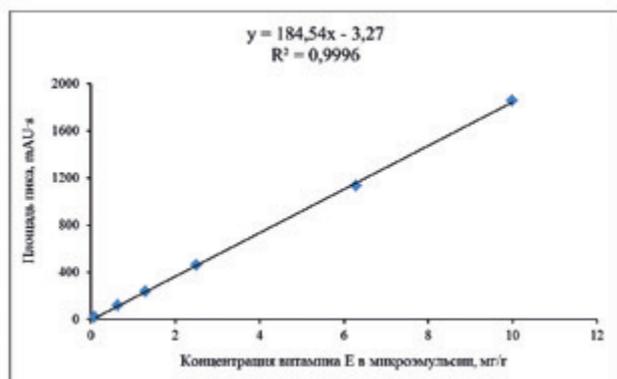


Рисунок 4. График зависимости площади пика витамина Е от концентрации

Для каждого образца проводили три определения, включающие все стадии методики. Согласно рекомендациям ICH [18] для оценки правильности использовали критерий обнаруживаемости определяемого вещества R, величина которого с учетом доверительного интервала должна находиться в пределах 98–102% [17]. Обнаруживаемость вычисляли по формуле:

$$R = \frac{\text{найденно аналита}}{\text{взято аналита}} \cdot 100\%.$$

Результаты оценки правильности методики представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты оценки правильности методики количественного определения витамина Е в микроэмульсии (n=9, p<0,95)

Взято, мг/г	Найдено, мг/г	Обнаруживаемость R, %
0,500	0,507	101,40
0,500	0,504	100,80
0,500	0,505	101,00
5,00	4,95	99,00
5,00	4,96	99,20
5,00	4,93	98,60
10,00	10,08	100,80
10,00	10,06	100,60
10,00	10,09	100,90
Среднее значение, %		100,26
Стандартное отклонение SD, %		1,03
Относительное стандартное отклонение RSD, %		1,02
Доверительный интервал среднего значения, %		99,59–100,93

В исследованном диапазоне измерений обнаруживаемость находится в интервале от 98,60 до 101,40%, её средняя величина составляет 100,26±0,67%, что соответствует критерию правильности методики.

Повторяемость

Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в течение короткого промежутка времени. Результаты 6 параллельных испытаний образца микроэмульсии приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты оценки повторяемости методики количественного определения витамина Е в микроэмульсии (C=5,0 мг/г, n=6, p<0,95)

Результаты анализа, мг/г	Средний результат, мг/г	Стандартное отклонение SD, мг/г	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Доверительный интервал среднего результата, мг/г
4,95	4,95	0,02	0,44	4,93-4,97
4,96				
4,93				
4,94				
4,92				
4,98				

Относительное стандартное отклонение отдельных результатов не превышает 2,0% и отвечает требованиям к методикам ВЭЖХ [17].

Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики изучали в условиях работы одной лаборатории. Анализ выполняли 2 исполнителя в разные дни на одном и том же оборудовании, результаты представлены в таблице 4.

Расчет F-критерия Фишера показал, что стандартные отклонения результатов анализов, полученных разными аналитиками, статистически эквивалентны. Средние результаты статистически достоверно не отличаются друг от друга (p<0,95). Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность методики соответствует требованиям, предъявляемым к этой валидационной характеристике [19].

Таблица 4.

Результаты оценки промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики количественного определения витамина Е в микроэмульсии (С=5,0 мг/г, n=6, p<0,95)

Исполнитель	Дата	Результаты анализа, мг/г	Средний результат, мг/г	Станд. отклонение SD, мг/г	Отн. станд. отклонение RSD, %
Исполнитель 1	22.01.18	4,95	4,96	0,02	0,44
	22.01.18	4,96			
	22.01.18	4,93			
	23.01.18	4,99			
	23.01.18	4,97			
	23.01.18	4,94			
Исполнитель 2	24.01.18	4,98	4,96	0,03	0,57
	24.01.18	4,92			
	24.01.18	4,95			
	25.01.18	4,93			
	25.01.18	4,97			
	25.01.18	4,99			

Аналитическая область

К величине аналитической области методик предъявляется следующее требование: методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой аналитической характеристики [17]. Поскольку содержание витамина Е в микроэмульсионных композициях может изменяться в широких пределах в зависимости от назначения композиции, то аналитическую область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

Интервал концентраций витамина Е в микроэмульсии, в котором доказан приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности, составил 0,1–10,0 мг/г.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о пригодности методики для количественного определения витамина Е в микроэмульсионных композициях.

Разработанная методика была апробирована на лабораторных образцах ТТС бромокаина и ТТС инсулина

Образец ТТС после удаления защитной пленки помещали в колбу Эрленмейера из темного стекла с притертой пробкой вместимостью 50 мл, добавляли 25 мл смеси ацетонитрил – этилацетат (80:20), перемешива-

ли содержимое и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 15 мин при температуре 25 °С. Отбирали из колбы 1 мл раствора, фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм и помещали в вialу для ВЭЖХ. Проводили 5 параллельных испытаний ТТС каждого вида и рассчитывали количество витамина Е в каждом образце. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Результаты определения витамина Е в лабораторных образцах ТТС бромокаина и инсулина (n=5, p<0,95)

ТТС	Номинальное количество витамина Е, мг	Результаты анализа, мг	Средний результат, мг	Отклонение от номинального значения, %
ТТС бромокаина	56,0	56,36	56,30	0,54
		56,23		
		56,46		
		56,19		
		56,17		
ТТС инсулина	10,0	10,42	10,35	3,52
		10,37		
		10,21		
		10,44		
		10,32		

Отклонение результатов, полученных с использованием разработанной методики, от фактических значений не превышает 5%.

Полученные результаты подтверждают возможность применения предлагаемой методики для контроля содержания витамина Е в лекарственных препаратах на основе микроэмульсий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения витамина Е в микроэмульсионных композициях методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Пригодность методики подтверждена соответствием основных валидационных характеристик – специфичности, линейности, правильности, промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности, аналитического диапазона – критериям приемлемости. Методика успешно апробирована на лабораторных образцах трансдермальных терапевтических систем бромокаина и инсулина, изготовленных на основе биосовместимых микроэмульсий.

Разработанная методика может быть включена в нормативную документацию в качестве способа определения витамина Е в микроэмульсиях и препаратах на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии / Под ред. Миттел К. – М.: Мир, 1980. 598 с.
2. Патент РФ 2481822, МПК А 61 К 9/113. Микроэмульсионные композиции для создания трансдермальных и трансмукозальных форм фармацевтических средств и косметических препаратов и способ их получения / Севастьянов В. И., Саломатина Л. А., Кузнецова Е. Г., Тихобаева А. А.; заявитель и патентообладатель Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий». – 2012.106092/15; заявл. 21.02.2012; опубл. 20.05.1013, Бюл. № 14. – 17 с.
3. Гаврилов А. С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов: учебник. – Глава 5. Вспомогательные вещества. – ГЭОТАР-Медиа. 2010. 624 с. [Gavrilov A. S. Farmatsevticheskaya tekhnologiya. Izgotovlenie lekarstvennykh preparatov: uchebnik. – Glava 5. Vspomogatel'nye veshchestva. – GEOTAR-Media. [Pharmaceutical technology. Manufacturing of medicines: textbook. – Chapter 5. Excipients.] 2010. 624 s.]
4. Демецкая А. Роль вспомогательных веществ в лекарственных препаратах // Фармацевт и Практик. 23.12.2014. [Demetskaya A. Rol' vspomogatel'nykh veshchestv v lekarstvennykh preparatakh // Farmatsevt i Praktik. [The role of auxiliary substances in medicinal preparations // Pharmacist and Practitioner]. 23.12.2014.]
5. Пирогов А. В. Определение жирорастворимых витаминов в зерновых премиксах, блендах, таблетированных биологически активных добавках и медпрепаратах методом ВЭЖХ // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74. № 3. С. 3–9. [Pirogov A. V. Opredelenie zhirorastvorimykh vitaminov v zernovykh premiksakh, blendakh, tabletirovannykh biologicheskii aktivnykh dobavkakh i medpreparatakh metodom VEZhKh // Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov. [Determination of fat-soluble vitamins in cereal pre-mixes, blends, tableted biologically active additives and medications by HPLC method // Plant laboratory. Diagnostics of materials.] 2008. T. 74. № 3. S. 3–9.]
6. Тринева О. В. Методы анализа витамина Е (обзор) // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013. № 1. С. 212–224. [Trineeva O. V. Metody analiza vitamina E (obzor) // Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. [Methods of analysis of vitamin E (review) // Vestnik VSU. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.] 2013. № 1. S. 212–224.]
7. The United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP 29-NF 24). USP Convention. Rockville, MD. 2006.
8. ОФС.1.2.3.0017.15. Методы количественного определения витаминов // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.
9. Григорьев А. М. Новые экспресс-методики определения жирорастворимых витаминов в сиропе «Олиговит» и таблетках «Алфавит» методом ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. Т. 6. Вып. 1. С. 62–69. [Grigor'ev A. M. Novye ekspress-metodiki opredeleniya zhirorastvorimykh vitaminov v sirope «Oligovit» i tabletkakh «Alfavit» metodom VEZhKh // Sorbtionnyye i khromatograficheskie protsessy. [New express methods for the determination of fat-soluble vitamins in the «Oligovit» syrup and «Alphabet» tablets by the HPLC method // Sorption and chromatographic processes.] 2006. T. 6. Vyp. 1. S. 62–69.]
10. ГОСТ EN 12822-2014. Продукты пищевые. Определение содержания витамина Е (альфа-, бета-, гамма- и дельта-токоферолов) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
11. Gupta S. K., Ramya M. G., Akki R., Kathirvel S., Naik V. V. Development and validation of new RP-HPLC methods for stability study of fat soluble vitamins // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2013. V. 5. P. 71–75.
12. Козлов Э. И. Определение витаминов А, D, E в поливитаминных препаратах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Хим.-фарм. журнал. 2003. Т. 37. № 10. С. 50–53. [Kozlov E. I. Opredelenie vitaminov A, D, E v polivitaminnykh preparatakh s pomoshch'yu vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii // Khim.-farm. zhurn. [Determination of vitamins A, D, E in multivitamin preparations using high-performance liquid chromatography // Khim.-farm. journal.] 2003. T. 37. № 10. S. 50–53.]
13. Бутина Э. А. Разработка технологии и оценка потребительских свойств витаминно-минеральных премиксов с использованием растительных фосфолипидов: автореф. дис. ... канд. техн. наук. – Краснодар. 2015. 133 с. [Butina E. A. Razrabotka tekhnologii i otsenka potrebitel'skikh svoystv vitaminno-mineral'nykh premiksov s ispol'zovaniem rastitel'nykh fosfolipidov: avtoref. dis. ... kand. tekhn. nauk. – Krasnodar. [Development of technology and evaluation of consumer properties of vitamin-mineral pre-mixes using plant phospholipids // Abstract. dis. Cand. tech. sciences. Krasnodar.] 2015. 133 s.]
14. Рыжикова В. А., Тихобаева А. А., Саломатина Л. А., Курсаков С. В., Кузнецова Е. Г., Курылева О. М., Севастьянов В. И. Влияние активатора переноса на функциональные свойства матричных трансдермальных терапевтических систем бромокаина // Перспективные материалы. 2014. № 2. С. 26–32. [Ryzhikova V. A., Tikhobaeva A. A., Salomatina L. A., Kursakov S. V., Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M., Sevast'yanov V. I. Vliyanie aktivatora perenosa na funktsional'nyye svoystva matrichnykh transdermal'nykh terapevticheskikh sistem bromokaina // Perspektivnyye materialy. [The influence of the transfer activator on the functional properties of matrix transdermal therapeutic systems of bromocaine // Perspective materials.] 2014. № 2. S. 26–32.]
15. Кузнецова Е. Г., Курылева О. М., Саломатина Л. А., Скалецкая Г. Н., Скалецкий Н. Н., Севастьянов В. И. Специфическая эффективность микроэмульсионной матричной трансдермальной терапевтической системы инсулина // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2017. № 3. С. 40–45. [Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M., Salomatina L. A., Skaletskaya G. N., Skaletskii N. N., Sevast'yanov V. I. Spetsificheskaya effektivnost' mikroemul'sionnoi matrichnoi transdermal'noi terapevticheskoi sistemy insulina // Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov. [Specific effectiveness of the microemulsion matrix transdermal therapeutic system of insulin // Bulletin of Transplantation and Artificial Organs.] 2017. № 3. S. 40–45.]
16. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.
17. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.
18. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology. Q2(R1). ICH: Geneva, 2005.
19. Эпштейн Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фарм. журнал. 2004. Т. 38. № 4. С. 40–56. [Epshtein N. A. Otsenka prigodnosti (validatsiya) VEZhKh-metodik v farmatsevticheskom analize (obzor) // Khim.-farmats. zhurn. [Validity assessment (validation) of HPLC techniques in pharmaceutical analysis (review) // Him-Pharmac. journal]. 2004. T. 38. № 4. S. 40–56.]

УДК 543.544; 615.074

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК: ИССЛЕДОВАНИЕ РОБАСТНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Н. А. Эпштейн^{1*}

Резюме. Рассмотрены теоретические и практические основы исследования робастности хроматографических методик с использованием планов Плакетта – Бермана. Пошагово, с пояснениями и примерами рассмотрено установление значимых (потенциально критических) факторов, а также определение допустимых пределов изменения значимых факторов и откликов. Оценка этих пределов важна для обоснования требований к пригодности хроматографической системы. Даны рекомендации по выполнению необходимых вычислений в Excel и оценке робастности хроматографических методик.

Ключевые слова: робастность, планы Плакетта – Бермана, риск, валидация, хроматографические методики, пригодность системы.

VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS: ROBUSTNESS INVESTIGATION WITH USE OF EXPERIMENTAL DESIGN

N. A. Epshtein^{1*}

Abstract. This article covers the theoretical and practical basics of research of the robustness of chromatographic methods on the base of Plackett – Burman design. Step by step, with explanations and examples, the estimation of significant (potentially critical) factors as well as the estimation of permissible limits of the changes of factors and responses are considered. The assessment of the limits is important for the justification of the requirements to the suitability of a chromatographic system. Also, we suggest the recommendations for performing necessary calculations in Excel and for the assessment of robustness of chromatographic methods.

Keywords: robustness, Plackett – Burman design, risk, validation, chromatographic methods, system suitability.

1 – АО «ШТАДА ФармДевелопмент» АО «НИЖФАРМ», 127273, Россия, г. Москва, ул. Отрадная, д. 2Б, стр. 9

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», SC «NIZHPHARM», 2B, b. 9, Otradnaya str., Moscow, 127273, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: naumepshtein@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Исследование робастности хроматографических методик является актуальной задачей фармацевтического анализа. В [1] был представлен новый подход к исследованию робастности хроматографических методик, включающий анализ рисков. При этом было обращено внимание на то, что метод математического планирования экспериментов (МПЭ) с использованием планов Плакетта – Бермана (Plackett – Burman design) имеет существенные преимущества по сравнению с «классическим» способом «One-factor-at-time». Однако математическое планирование экспериментов пока еще сравнительно редко применяют для исследования робастности хроматографических методик. Это вызвано прежде всего человеческим фактором – отсутствием необходимых знаний и в связи с этим преувеличенным представлением о сложности исследования робастности методик с использованием МПЭ.

Цель статьи – в доступной форме рассмотреть теоретические и практические основы исследования робастности хроматографических

методик с использованием планов Плакетта – Бермана и при этом пошагово пояснить необходимые действия, а также дать рекомендации по выполнению необходимых вычислений в Excel.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Определения основных терминов, связанных с исследованием робастности методик, таких как риск, критичность, вероятность, контролируемые отклики, критический фактор и т.д., приведены в [1]. Уточним только то, что следует понимать под терминами «отклик» и «фактор» при исследовании робастности аналитических методик.

Отклик (Response) – *измеряемое или вычисляемое на основании измерения количество, которое является предметом исследования.* При исследовании робастности хроматографических методик рассматривают такие отклики, как характеристики, указанные в требованиях к пригодности хроматографической системы (разрешение между определенными пиками R_s , фактор асимметрии пика $T_{0,05}$, число теоретических та-

релок N , отношение сигнал – шум базовой линии S/N), нормируемое содержание основных веществ и примесей, спектральная чистота пиков, а также другие отклики в зависимости от типа методики [1].

Фактор (Factor) – причина, связанная с исследуемой методикой, потенциально способная повлиять на значение отклика. Для методик ВЭЖХ факторами являются рН, скорость потока подвижной фазы (ПФ), длина волны, температура термостатирования колонки и образцов, длительность уравнивания системы до начала хроматографирования и в конце градиента, факторы, связанные с составом ПФ, серия сорбента и т.д. [1].

Из теории математического планирования экспериментов известно, что наиболее полную информацию об анализируемом объекте можно получить с помощью полного факторного эксперимента (Full Factorial Design, FLFD) [2–7]. Однако FLFD имеет существенный недостаток: он требует максимально большого количества экспериментов по сравнению с другими планами при одинаковом количестве рассматриваемых факторов. Поэтому полный факторный эксперимент очень редко используют для исследования робастности методики и при этом, как правило, рассматривают не более 3 факторов [8]. Обычно используют дробный факторный эксперимент (Fractional Factorial Design), причем наиболее часто применяют двухуровневые планы Плакетта – Бермана [2, 6, 7, 9–34]. В обзоре [29] даны ссылки на несколько публикаций, в которых для исследования робастности хроматографических методик (при валидации), помимо планов Плакетта – Бермана, использовали некоторые другие виды дробного факторного эксперимента.

Преимущество планов Плакетта – Бермана заключается в том, что они дают возможность исследовать влияние на отклики максимального количества факторов k при минимальном количестве экспериментов – строк в матрице планирования экспериментов N . Для планов Плакетта – Бермана $N=k+1$. Это означает, что количество экспериментов – условий хроматографирования – должно быть всего лишь на единицу больше, чем количество факторов.

Суть планов Плакетта – Бермана заключается в отсеивании незначимых/несущественных факторов (называемых иногда шумовым фоном [4]) и установлении **значимых факторов**, тех, которые статистически значимо влияют на отклики. Планы Плакетта – Бермана основываются на наиболее простой – линейной модели взаимосвязи между откликом и факторами:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i, \quad (1)$$

где Y – значение отклика, b_0 и b_i – коэффициенты, X_i – факторы. Из-за использования линейной модели существует риск потери части информации, связанный с возможностью влияния на отклики взаимодействия

факторов между собой. Однако было показано, что эта модель допустима для исследования робастности хроматографических методик, так как можно пренебречь взаимодействием факторов [6, 9].

Построение двухуровневых планов Плакетта – Бермана имеет следующие характерные особенности [4, 6]: факторы варьируют на двух уровнях – верхнем и нижнем, обозначаемых соответственно «+1» (или «+») и «-1» (или «-»). Используют число строк, кратное 4, то есть в общем случае $N=4, 8, 12, 16, 20, 24$ и т.д. Количество факторов должно быть $k=N-1$. Планы с $N=4$ не применяют по статистическим причинам.

Первая строка плана в зависимости от количества экспериментов N и, следовательно, количества факторов $k=N-1$, задается в виде:

$N=8$ ($k=7$): + + + - + - -

$N=12$ ($k=11$): + + - + + + - - - + -

$N=16$ ($k=15$): + + + + - + - + - - - - -

$N=20$ ($k=19$): + + - - + + + - + - - - - + +

$N=24$ ($k=23$): + + + + - + - + - - - + + - - + - - - -

Вторую и последующие строки получают путем сдвига всех элементов предыдущей строки на одну позицию вправо (или влево) и соответственно перестановки последнего (первого) элемента на первую (последнюю) позицию. Этот процесс повторяют $N-2$ раз. Последняя строка плана состоит только из элементов «-», то есть «-1».

В публикациях, а также в нашем примере (будет показано ниже) часто можно увидеть иное расположение «+» и «-» в строках планов Плакетта – Бермана. Это связано с тем, что обычно после формирования матрицы плана в ней дополнительно перемещают строки случайным образом, чтобы минимизировать влияние внешних факторов. Каждому фактору в матрице соответствует определенный столбец; не рекомендуется использовать для одного фактора несколько столбцов, так как это может приводить к неявному дополнительному влиянию случайных ошибок и двухфакторных взаимодействий [16].

Для исследования робастности методик определения примесей чаще всего применяют планы Плакетта – Бермана с $N=12$ ($k=11$), так как они, во-первых, дают возможность учесть в большинстве случаев все факторы высокого и среднего риска [1], и, во-вторых, после внесения в матрицу реальных факторов обычно остаются столбцы, которые можно рассматривать как **фиктивные (dummy) факторы** и использовать их для оценки значимости факторов.

При оценке статистической значимости влияния факторов на отклики с помощью t-критерия Стьюдента или методом ANOVA (дисперсионный анализ) используют не менее трех фиктивных факторов. Поэтому, когда количество реальных факторов $k>8$, мо-

жет потребоваться план Плакетта – Бермана с $N=16$ ($k=15$) [18]. В редких случаях применяют другие варианты плана Плакетта – Бермана, например так называемый Augmented Plackett – Burman of III resolution с дополнительными строчками в матрице, в которых все факторы находятся на номинальном уровне (0), для оценки воспроизводимости методики [35]. Однако мы будем рассматривать только те планы Плакетта – Бермана, которые получаются по классическому способу со случайной перестановкой строк.

ОЦЕНКА РОБАСТНОСТИ МЕТОДИК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАНОВ ПЛАКЕТТА – БЕРМАНА

Этап 1. Определение факторов высокого и среднего риска и контролируемых откликов. Задание допустимых пределов изменения факторов и допустимых пределов изменения откликов

Этот этап подробно рассмотрен в [1], поэтому не будем на нем останавливаться. Просто отметим, что в качестве примера в таблице 1 приведены допустимые пределы изменения факторов высокого и среднего риска, а в таблице 2 – контролируемые отклики и их допустимые пределы изменения для модельной градиентной методики ВЭЖХ определения содержания примесей (далее – методики определения примесей).

Таблица 1.

Факторы высокого и среднего риска [1] для исследования робастности методики

№	Факторы (Xi)	Единица измерения	Значение по методике	Предел изменения [1]	Значение на уровне (-1)	Значение на уровне (+1)
1.	Значение pH буфера, pH	pH	4,5	±0,1	4,4	4,6
2.	Скорость потока ПФ, Flow	мл/мин	1,0	±10%	0,9	1,1
3.	Градиент: начальная точка – % более сильной ПФ, V_{min}	%	10	±2% отн.	9,98	10,2
4.	Градиент: конечная точка – % более сильной ПФ, V_{max}	%	90	±2% отн.	88,2	91,8
5.	Длина волны, λ	нм	272	±2 нм	270	274
6.	Хроматографическая колонка (Column)*	–	–	–	1*	2*
7.	Температура колонки, T, °C	°C	30	±3 °C	27	33
8.	Концентрация соли в буфере, C_{Buff}	моль/л	0,01	±25%	0,0075	0,0125

Примечание: *Колонки с одинаковым сорбентом, но упакованные разными производителями.

Таблица 2.

Контролируемые отклики и их допустимые пределы изменения

	Отклики	Обозначение	Единица измерения	Допустимые пределы изменения откликов [1]
Y_1	Содержание идентифицированной примеси	C_{ID}	%	Допустимый предел изменения отклика относительно значения полученного по методике: ±10% для примесей >1,0%; ±25% для примесей от > 0,1% до 1,0%; ±50% для примесей до 0,1%
Y_2	Содержание наибольшей неидентифицированной примеси	C_U	%	То же
Y_3	Сумма примесей	Σ_{imp}	%	То же для Σ_{imp}
Y_4	Число теоретических колонок	N	т.т.	Не менее 2000 т.т. (требование по методике)
Y_5	Фактор асимметрии пика основного вещества	$T_{0,05}$	–	более 1,5 (требование по методике)
Y_6	Разрешение между пиками, указанными в требованиях к пригодности хроматографической системы (System Suitability)	R_S	–	Не менее 2,0 (требование по методике)
Y_7	Разрешение между двумя пиками примесей, которые наиболее сильно перекрываются.	v	–	Peak-to-valley ratio $v \geq 1,5$
Y_8	Относительное стандартное отклонение при хроматографировании раствора сравнения	RSD	%	Не более 5,0% (требование по методике)
Y_9	Отношение сигнал – шум S/N на хроматограмме раствора для проверки чувствительности системы	S/N	–	≥10 (требование по методике)
Y_{10}	Время удерживания основного вещества	RT	мин	±15% (градиент)
Y_{11}	Относительное время удерживания примеси, указанное в методике	RRT	–	±15% (градиент)
Y_{12}	Спектральная чистота пика**	Purity	–	Пик должен быть спектрально чистым (СЧ)

Примечание: **Для методик определения примесей пики лекарственных веществ и пики примесей с поправочными коэффициентами должны быть СЧ.

Этап 2. Составление матрицы планирования экспериментов

Строят матрицу плана Плакетта – Бермана, изменяют в ней расположение строк случайным образом (рандомизацией). При этом к матрице планирования экспериментов можно для наглядности, но не обязательно, добавить справа столбцы контролируемых откликов, см. таблицу 3.

Этап 3. Проведение анализов и определение значений контролируемых откликов

При исследовании робастности хроматографических методик условия хроматографирования задают строки матрицы плана Плакетта – Бермана. Поэтому анализы проводят следующим образом:

- в соответствии с первой строкой матрицы (условия хроматографирования № 1) берут реальные значения факторов на верхнем пределе, если в строке для фактора стоит «+1», или на нижнем пределе, если стоит (-1). При этих значениях факторов хроматографируют растворы так, как это указано в валидируемой методике;
- в соответствии со второй строкой матрицы (условия хроматографирования № 2) берут реальные значения факторов и при этих значениях факторов хроматографируют растворы так, как это указано в валидируемой методике, и т.д.

Для каждой условия хроматографирования – строк матрицы определяют значения контролируемых откликов и заносят их в таблицу 3 или в отдельную

таблицу 4, имеющую такой же порядок строк, как и таблица 3.

После этого переходят к этапам статистического анализа полученных результатов.

Примечание. При исследовании робастности методик определения примесей рекомендуем определять/контролировать значения откликов при номинальных условиях (по методике) перед началом и по окончании исследования робастности, чтобы быть уверенными, что отклики и, следовательно, сама аналитическая система существенно не изменились в ходе исследования робастности.

Этап 4. Вычисление эффектов факторов

Этот этап является обязательным для первых пяти из шести способов определения значимых факторов, рассматриваемых в этой статье.

Для каждого фактора X_i вычисляют его эффект на отклик Y по формуле:

$$E_{X_i}^Y = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}, \quad (2)$$

где $Y(+)$ – сумма тех значений в столбце отклика Y , которым соответствует «+1» в столбце фактора X_i ; $Y(-)$ – сумма тех значений в столбце отклика Y , которым соответствует «-1» в столбце фактора X_i , N – количество строк в матрице планирования экспериментов. Значения $\sum Y(+)$ и $\sum Y(-)$ удобно вычислять в Excel с помощью функций типа

Таблица 3.

Матрица планирования экспериментов Плакетта – Бермана для исследования робастности методики определения примесей методом ВЭЖХ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13				Z
№*	λ	Flow	Dum 1	V_{min} , %	V_{max} , %	pH	Dum 2	Column	T, °C	C_{Buff}	Dum 3	Y_1	Y_2	...	$Y_6(R_S)$...	Y_{12}
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1				2,22		
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1				2,77		
3	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1				2,85		
4	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1				2,49		
5	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1				2,69		
6	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1				2,62		
7	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1				2,92		
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1				2,14		
9	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1				2,18		
10	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1				2,88		
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1				2,57		
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1				2,77		

Примечание: *№ – порядковый номер эксперимента (каждая строка – это условия хроматографирования).

Столбцы 1÷11 – факторы из таблицы 1; столбцы 12÷Z – результаты определения значений контролируемых откликов Y (таблица 4); Dum – фиктивный (dummy) фактор. Выделена 8-я строка, так как она используется в примере по определению наихудшего случая для отклика R_S .

Таблица 4.

Результаты определения значений контролируемых откликов Y*

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂
№**	C _{ID}	C _U	Σ _{imp}	N	T _{0,05}	R _S	v	RSD	S/N	RT	RRT	Purity
1	0,20	0,14	0,45	2551	1,20	2,22	1,28	1,25	17	11,121	1,12	СЧ***
2	0,25	0,13	0,46	2535	1,13	2,77	1,52	0,92	33	12,175	1,18	СЧ
3	0,23	0,15	0,43	2539	1,25	2,85	1,67	1,35	18	11,023	1,17	СЧ
4	0,24	0,17	0,51	2537	1,23	2,49	1,84	0,98	27	11,521	1,11	СЧ
5	0,22	0,15	0,49	2529	1,28	2,69	1,56	1,21	26	11,655	1,13	СЧ
6	0,26	0,16	0,48	2537	1,16	2,62	1,76	0,86	21	11,075	1,15	СЧ
7	0,25	0,16	0,49	2524	1,28	2,92	1,97	1,26	18	12,633	1,10	СЧ
8	0,21	0,13	0,49	2534	1,24	2,14	1,66	0,94	13	11,027	1,12	СЧ
9	0,22	0,12	0,39	2537	1,19	2,18	2,42	0,99	28	12,004	1,14	СЧ
10	0,25	0,12	0,45	2539	1,15	2,88	2,08	1,28	23	11,156	1,09	СЧ
11	0,24	0,13	0,44	2534	1,12	2,57	2,15	0,87	19	12,215	1,16	СЧ
12	0,24	0,15	0,48	2533	1,20	2,77	1,82	1,14	22	11,121	1,12	СЧ

Примечание: * Расшифровка обозначений контролируемых откликов дана в таблице 2.

**№ – порядковый номер эксперимента в матрице планирования экспериментов (таблица 3);

***СЧ – пик лекарственного вещества спектрально чистый.

$$= \text{СУММЕСЛИ}(B5:B16; >> 0; M20:M31) / (N/2)$$

и

$$= \text{СУММЕСЛИ}(B5:B16; >< 0; M20:M31) / (N/2),$$

где B5:B16 – диапазон ячеек рассматриваемого фактора (столбец значений фактора X_i) в матрице планирования экспериментов (таблица 3), M20:M31 – диапазон ячеек рассматриваемого отклика (столбец значений отклика Y в таблице 3 или в таблице 4); N – количество строк в матрице планирования экспериментов¹.

Иногда используют нормализованные эффекты факторов:

$$E_{X_i}^Y (\%) = \frac{E_{X_i}^Y \cdot 100}{\bar{Y}}, \quad (3)$$

где \bar{Y} – среднее значение откликов в столбце отклика Y .

В таблице 5 в качестве примера приведены расчетные значения эффектов факторов на контролируемые отклики $E_{X_i}^Y$. В этой таблице каждый столбец – это эффекты всех факторов относительно отклика, указанного в заголовке столбца (расчет по формуле 2), а каждая строка – это эффекты фактора, указанного в начале строки, на все отклики.

Этап 5. Нахождение значимых (потенциально критических) факторов

Этот этап, по нашему мнению, является определяющим при исследовании робастности хроматографических методик, и к нему надо относиться с особым

вниманием. Как показала практика, при исследовании робастности методик, связанных с определением примесей, результат определения значимых факторов может зависеть от используемого критерия, то есть от способа оценки значимости факторов; при этом бывают ситуации, когда нельзя отдать предпочтение какому-то одному критерию [14]. Это наглядно показано ниже в разделе, посвященном алгоритму Донга. В связи с вышесказанным для повышения надежности исследования робастности методик определения примесей рекомендуем использовать не менее двух способов оценки значимых факторов.

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ЗНАЧИМЫХ ФАКТОРОВ

5.1. Графическая оценка значимых факторов по графику *Normal probability plot* или *Half-normal probability plot*

Normal probability plot

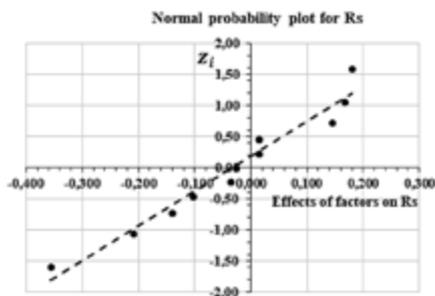
Для визуальной оценки значимых факторов нередко используют график нормального распределения, по-видимому, из-за того, что автоматическое построение графика нормального распределения включено во многие программы статистической обработки данных.

График нормального распределения можно легко построить «вручную». Пример построения графика нормального распределения для отклика R_S с использованием Excel представлен на рисунке 1 (верхний график). Для его построения использованы данные,

¹ Русскоязычная функция СУММЕСЛИ эквивалентна SUMIF.

Данные, использованные для построения графика Normal probability plot для отклика Rs

E_{Xi}^{Rs}	i	f_i	z_i
-0,357	1	0,06	-1,59
-0,210	2	0,14	-1,06
-0,140	3	0,23	-0,73
-0,103	4	0,32	-0,46
-0,037	5	0,41	-0,22
-0,027	6	0,50	0,00
0,013	7	0,59	0,22
0,013	8	0,68	0,46
0,143	9	0,77	0,73
0,167	10	0,86	1,06
0,180	11	0,94	1,59



Данные, использованные для построения графика Half-normal probability plot для отклика Rs

№	$ E_{Xi}^{Rs} $	Rankit	ME	SME	$ E_{Xi,critical}^Y $
1	0,013	0,06	0,412	0,653	0,291
2	0,013	0,17	0,412	0,653	0,291
3	0,103	0,29	0,412	0,653	0,291
4	0,140	0,41	0,412	0,653	0,291
5	0,143	0,53	0,412	0,653	0,291
6	0,180	0,67	0,412	0,653	0,291
7	0,210	0,81	0,412	0,653	0,291
8	0,357	0,98	0,412	0,653	0,291

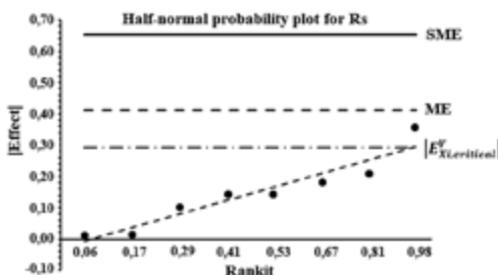


Рисунок 1. Графики Normal probability plot и Half-normal probability plot для определения змых факторов при $\alpha=0,05$ ($P=95\%$). Эффекты факторов E_{Xi}^{Rs} и их абсолютные величины расположены в таблицах по возрастанию значений (пояснения см. в тексте)

приведенные в таблице расположенной слева от графика. В первом столбце этой таблицы приведены значения эффектов факторов E_{Xi}^{Rs} в порядке возрастания, во втором столбце – номера строк (i), в третьем столбце – параметр f_i , который вычисляется по формуле [36]

$$f_i = (i - 0,375) / (n + 0,25), \quad (3)$$

где n – количество эффектов факторов (строк в таблице). В четвертом столбце – параметр z_i , вычисляемый в Excel по формуле =НОРМ.СТ.ОБР(f_i), которая возвращает обратное значение стандартного нормального распределения¹.

Теоретически график нормального распределения должен проходить через ноль. Поэтому как незна-

Таблица 5.

Расчетные значения эффектов факторов E_{Xi}^Y на отклики Y

Фактор	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂
	C _{ID}	C _U	Σ _{imp}	N	T _{0,05}	R _S	v	RSD	S/N	RT	RRT	Purity
λ	-0,008	-0,005	0,000	3,500	-0,002	0,013	-0,282	0,018	2,500	-0,145	0,020	-
Flow	0,015	-0,005	-0,003	1,833	-0,058	0,143	-0,035	-0,028	-0,500	0,076	0,013	-
Dum 1	-0,008	-0,005	-0,030	5,833	0,005	-0,037	-0,032	0,138	0,167	-0,704	-0,003	-
B _{min} , %	0,002	-0,012	-0,030	0,500	-0,042	-0,140	0,105	-0,198	-0,167	-0,209	0,030	-
B _{max} , %	-0,015	-0,015	-0,017	5,833	-0,028	-0,357	0,188	-0,072	-1,833	-0,368	-0,007	-
pH	-0,005	0,018	0,023	2,500	0,048	-0,103	-0,228	0,038	-6,167	-0,582	-0,013	-
Dum 2	0,008	0,012	0,007	-5,500	0,015	-0,027	0,278	-0,118	2,167	0,319	0,003	-
Column	-0,018	-0,008	-0,003	-1,500	0,035	-0,210	-0,152	0,015	0,833	0,156	0,010	-
T, °C	0,008	0,002	0,033	-1,167	-0,008	0,013	-0,148	-0,112	3,500	-0,512	0,000	-
C _{Buff}	0,012	-0,002	-0,017	-1,167	0,005	0,180	0,212	0,085	4,833	0,122	-0,013	-
Dum 3	-0,002	-0,005	0,003	-5,167	0,035	0,167	0,075	0,128	-5,167	-0,146	-0,020	-
Критические значения эффектов факторов по отношению к откликам – $E_{Xi,critical}^Y$, вычисленные с использованием t-критерия Стьюдента по формуле (5)												
α=0,05	0,020	0,023	0,052	16,080	0,065	0,291	0,489	0,375	9,449	1,326	0,035	
α=0,1	0,013	0,015	0,034	10,384	0,042	0,188	0,316	0,242	6,102	0,856	0,022	
Критические значения эффектов факторов по отношению к откликам – ME и SME, вычисленные по формулам (9) и (10)												
ME (α=0,05)	0,038	0,023	0,046	6,373	0,080	0,412	0,423	0,211	7,482	0,750	0,036	
ME (α=0,1)	0,027	0,019	0,037	5,140	0,064	0,332	0,341	0,170	6,034	0,605	0,029	
SME (α=0,05)	0,043	0,037	0,072	10,119	0,127	0,653	0,671	0,335	11,879	1,191	0,058	

¹ Функция НОРМ.СТ.ОБР эквивалентна NORM.S.INV.

чимые/несущественные факторы рассматривают те, для которых значения z_i располагаются вблизи линии тренда, проходящей около нуля, а как значимые/существенные – те, которые существенно отклоняются от линии тренда. Из рисунка 1 видно, что существенно отклоняется от линии тренда только крайняя точка справа, ей соответствует эффект $E_{X_i}^{Rs} = 0,180$. Для того чтобы определить, какому фактору соответствует это значение, смотрим таблицу 5, столбец Rs, находим в нем число 0,180 и по строке определяем фактор – C_{Buff} . На основании полученного результата можно было бы предположить, что концентрация буфера является значимым (потенциально критическим) фактором. Однако это предположение в дальнейшем не подтвердилось. В общем случае более надежным, по нашему мнению, является определение значимых факторов с использованием графика Half-normal probability plot.

Half-normal probability plot

Построение этого графика будет рассмотрено ниже, в разделе, посвященном алгоритму Донга. Отметим только то, что для отклика Rs на графике Half-normal plot более четко (чем на Normal probability plot) видна отклоняющаяся от тренда точка – крайняя справа: $E_{X_i}^{Rs} = -0,357$ (рисунок 1). Она соответствует фактору B_{max} в таблице 5 и указывает на значимое влияние «% более сильной ПФ» в конце градиента; это подтвердилось в дальнейшем.

Подчеркнем, что определение значимых факторов с помощью графика Normal probability plot или Half-normal probability plot полезно, но недостаточно, так как в значительной мере субъективно, и его можно использовать только как дополнение к статистической оценке значимых факторов.

5.2. Определение значимых факторов с использованием t-критерия Стьюдента [16]

Для каждого фактора X_i можно выразить значение t-критерия Стьюдента в виде:

$$t = \frac{|E_{X_i}^Y|}{SD_Y}, \quad (4)$$

где $|E_{X_i}^Y|$ – абсолютное значение эффекта фактора X_i относительно отклика Y , вычисленное по формуле (2); SD_Y – стандартное отклонение, рассчитанное определенным образом (см. ниже). Подставив в (4) табличное (критическое) значение t-критерия Стьюдента (t_{tab}), получаем выражение для критического значения эффекта фактора X_i относительно отклика Y :

$$|E_{X_i, \text{critical}}^Y| \equiv E_{X_i, \text{critical}}^Y = t_{\text{tab}} \cdot SD_Y. \quad (5)$$

Из формулы (5) следует, что для вычисления $E_{X_i, \text{critical}}^Y$ необходимо знать величину стандартного отклонения SD_Y , а также критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента t_{tab} при заданных значениях числа степеней свободы f и уровня значимости α . Берут односторонний t-критерий Стьюдента, так как речь идет о предельных значениях. Значение t_{tab} можно вычислить в Excel с помощью формулы =СТЬЮДЕНТ.ОБР((1- α); f). В этой формуле число степеней свободы $f=n-1$, где n – количество точек данных при определении SD_Y ; α – уровень значимости – вероятность отвергнуть нулевую гипотезу (о том, что эффект фактора является значимым), когда гипотеза на самом деле верна: $\alpha=1-P$, где P – доверительная вероятность, выраженная в долях от единицы. Чаще всего берут $\alpha=0,05$ ($P=95\%$) и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$), очень редко – $\alpha=0,01$ ($P=99\%$)¹.

Эффект фактора X_i относительно отклика Y является значимым при заданном уровне значимости α , если $|E_{X_i}^Y| > E_{X_i, \text{critical}}^Y = t_{\text{tab}} \cdot SD_Y$.

Способы определения стандартного отклонения SD_Y

Вычисление SD_Y с использованием эффектов фиктивных (dummy) факторов. Этот способ вычисления SD_Y основан на априорном предположении, что все фиктивные эффекты являются незначимыми. Для вычисления SD_Y применяют формулу:

$$SD_Y = \sqrt{\frac{\sum E_{\text{dummy}; Y}^2}{n_{\text{dummy}}}}, \quad (6)$$

где $\sum E_{\text{dummy}; Y}^2$ – сумма квадратов эффектов фиктивных (dummy) факторов для рассматриваемого отклика Y ; n_{dummy} – число фиктивных факторов в матрице планирования экспериментов. Алгоритм действий следующий. Для каждого контролируемого отклика вычисляют SD_Y по формуле (6), подставляют его в формулу (5) и вычисляют критические значения эффектов для заданных уровней значимости (обычно для $\alpha=0,05$ и $\alpha=0,1$). Анализируют столбцы в таблице эффектов факторов на наличие в столбце значений, превышающих по абсолютной величине критическое значение эффекта для соответствующего отклика $E_{X_i, \text{critical}}^Y$. Те отклики, для которых $|E_{X_i}^Y| > E_{X_i, \text{critical}}^Y$, рассматриваются как значимые для заданного уровня значимости α .

Недостатком этого способа вычисления SD_Y является то, что для обеспечения статистической достоверности оценки SD_Y необходимо включать не менее 3 фиктивных факторов. При $N=8$ и использовании 3 фик-

¹ Функция СТЬЮДЕНТ.ОБР эквивалентна T.INV.

тивных факторов для определения SD_Y остается только 4 столбца для включения реальных факторов, однако этого в большинстве случаев недостаточно для методик определения примесей, так как для них количество факторов высокого и среднего риска обычно больше, чем 4 [11]. Как следствие, приходится использовать матрицу с $N=12$ (можно включить до 8 реальных факторов), а это существенно увеличивает объем работ.

Вычисление SD_Y в ходе определения внутрилабораторной прецизионности методики. В [9, 16] предложено в качестве SD_Y в формуле (5) использовать результаты, полученные при исследовании внутрилабораторной прецизионности методики. Такая возможность подтверждена пока только на примере методики количественного определения [9]. С теоретической точки зрения значения SD_Y можно было бы определять и в ходе исследования внутрилабораторной прецизионности методик определения примесей, однако это связано с риском неправильных выводов в случае очень близко расположенных или частично перекрывающихся примесей. Поэтому надежнее и проще использовать фиктивные факторы для определения SD_Y .

Пример определения значимых факторов в таблице 5 с использованием t-критерия Стьюдента. В верхней части этой таблицы приведены расчетные значения эффектов факторов $E_{X_i}^Y$ на отклики Y , вычисленные по формуле (2), а в нижней – критические значения эффектов $E_{X_i, critical}^Y$ для каждого столбца при уровнях значимости $\alpha=0,05$ ($P=95\%$) и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$). Для определения значимых факторов в таблице 5 последовательно рассматривают столбцы (они содержат эффекты факторов для отклика, указанного в названии столбца) и сравнивают абсолютные значения эффектов факторов в каждом из столбцов с критическими значениями $E_{X_i, critical}^Y$, расположенным в нижней части столбца. Такой анализ таблицы 5 показывает следующее. При $\alpha=0,05$ критическое значение превышено только в столбе R_s : в нем у фактора V_{max} абсолютное значение эффекта, равное $-0,357$ (выделено жирным шрифтом), больше, чем $E_{X_i, critical}^Y = 0,291$. Следовательно, с доверительной вероятностью 95% только фактор V_{max} , то есть «% более сильной ПФ в конце градиента», является значимым. При $\alpha=0,1$ ($P=90\%$) значимых факторов существенно больше – они отмечены курсивом, но меньше вероятность того, что эти факторы действительно являются значимыми.

5.3. Определение и графическое представление значимых факторов с помощью стандартизованной диаграммы Парето (Standardized Pareto Chart)

Этот способ оценки значимых факторов по своей сути аналогичен способу, рассмотренному выше, и не имеет перед ним преимуществ за исключением

возможности наглядно иллюстрировать определение значимых факторов, а это иногда важно для презентации результатов.

Для каждого отклика Y вычисляют стандартизованные значения эффектов факторов $|E_{X_i}^Y| / SD_Y$, то есть отношение абсолютного значения эффекта фактора X_i по отклику Y к стандартному отклонению рассматриваемого отклика. Значения $E_{X_i}^Y$ вычисляют по формуле (2), а SD_Y – как описано выше, в разделе 5.2. Строят диаграмму, например, следующим образом (рисунок 2, верхняя диаграмма). Слева от оси ординат наносят названия факторов, причем факторы располагаются сверху вниз в порядке убывания величины стандартизованных значений эффектов. Справа от оси ординат, напротив названий факторов, наносят узкие прямоугольники, длина которых пропорциональна стандартизованным значениям эффектов факторов [24]. Так как $|E_{X_i}^Y| / SD_Y$ является t-критерием Стьюдента, то для определения значимых факторов на график Парето наносят вертикальную линию – критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента для заданной доверительной вероятности, например $P=95\%$ ($\alpha=0,05$). При таком построении диаграммы значимыми (с соответствующей доверительной вероятностью) являются те факторы, у которых прямоугольник пересекает вертикальную линию табличного значения t-критерия Стьюдента: у этих факторов экспериментальное значение t-критерия Стьюдента больше, чем табличное значение.

Вместо горизонтальной диаграммы Парето, как на рисунке 2 сверху, можно построить диаграмму с вертикальными столбцами – рисунок 2, нижняя диаграмма. На такой диаграмме значимыми (с соответствующей доверительной вероятностью) являются те факторы, у которых прямоугольник заканчивается выше линии табличного значения t-критерия Стьюдента. Недостатком такой диаграммы является то, что при презентации на ней труднее читать названия факторов, так как они расположены под углом к оси абсцисс.

На рисунке 2 в качестве примера приведена стандартизованная диаграмма Парето для отклика R_s . Она наглядно показывает, что при доверительной вероятности $P=95\%$ ($\alpha=0,05$) значимым фактором является только V_{max} , то есть «% более сильной ПФ в конце градиента».

Примечание: для определения значимых факторов в зависимости от уровня значимости на диаграмму Парето наносят линии табличных значений критерия Стьюдента, соответствующие не только уровню значимости $\alpha=0,05$ ($P=95\%$), но и $\alpha=0,1$ ($P=90\%$), а иногда и $\alpha=0,01$ ($P=99\%$).

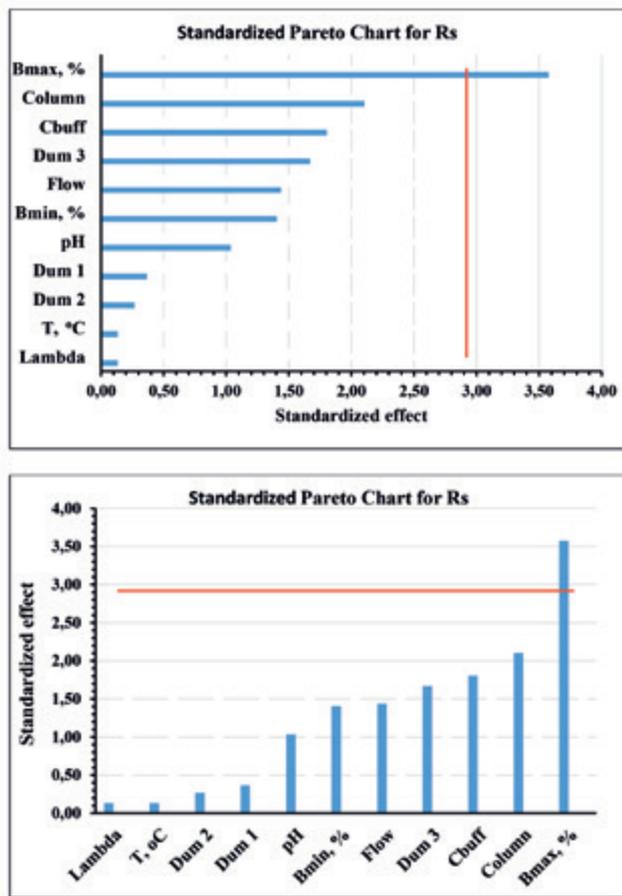


Рисунок 2. Два вида стандартизированной диаграммы Парето. На верхней диаграмме ось ординат – факторы; прямоугольник рядом с фактором – стандартизированное значение эффекта фактора $|E_{X_i}^Y|/SD_Y$. Вертикальная красная линия – критическое (табличное) значение одностороннего t-критерия Стьюдента для вероятности P=95% ($\alpha=0,05$). На нижней диаграмме обозначения такие же (пояснения см. в тексте)

5.4. Определение и графическое представление значимых факторов с использованием алгоритма Донга; критерии ME и SME

В настоящее время для оценки значимости эффектов наиболее часто применяют алгоритм Донга (Dong) [16, 37], так как он не требует использования фиктивных факторов. Это дает возможность для многих методик определения примесей перейти от матрицы планирования экспериментов с N=12 к N=8 и значительно сократить объем экспериментальных работ.

Алгоритм Донга заключается в следующем.

1. Вычисляют исходную оценку ошибки (initial error estimate) по формуле:

$$SD_0^Y = 1,5 \cdot \text{median} |E_X^Y|, \quad (i=1, 2, \dots, N) \quad (7)$$

где $\text{median} |E_X^Y|$ – медиана абсолютных значений эффектов всех факторов относительно рассматриваемого отклика Y; N – число строк в матрице планирования

экспериментов. На практике это означает, что для каждого отклика Y – столбца в таблице 5 – вычисляют медиану абсолютных значений эффектов факторов (функция МЕДИАНА или MEDIAN в Excel) и умножают ее на 1,5.

2. Вычисляют стандартную ошибку (standard error) по формуле:

$$SD_1^Y = \sqrt{\frac{\sum (E_X^Y)^2}{m}} \quad \text{для} \quad |E_X| \leq 2,5 \cdot SD_0, \quad (8)$$

где $\sum (E_X^Y)^2$ – сумма квадратов эффектов тех факторов (относительно рассматриваемого отклика Y), у которых абсолютное значение меньше или равно $2,5SD_0$; m – число таких эффектов.

Примечание. Если окажется, что доля значимых эффектов велика (ориентировочно $\geq 50\%$), то с теоретической точки зрения можно использовать алгоритм Донга с итерацией. Для этого в формулу (8) в условие $|E_X| \leq 2,5SD_0$ вместо SD_0 подставляют SD_1 , заново определяют SD_1 и т.д. Однако в таких случаях лучше использовать фиктивные факторы, даже если для этого надо будет увеличить размер матрицы планирования экспериментов [16].

3. Вычисляют критическое значение эффекта фактора, называемое Margin of Error (предел погрешности):

$$ME = t_{(1-\alpha/2; df)} \cdot SD_1^Y, \quad (9)$$

где t – критерий Стьюдента для уровня значимости α ; $df=m$ – число степеней свободы, где m – число эффектов, абсолютное значение которых меньше $2,5SD_0$. Значение $t_{(1-\alpha/2; df)}$ можно определять в Excel с помощью функции =СТЮДЕНТ.ОБР(значение $1-\alpha/2$; значение m).

При большом числе факторов повышается вероятность того, что какой-то незначимый эффект фактора превысит значение ME. Поэтому Донг рекомендует использовать еще и дополнительный критерий оценки значимости эффектов факторов, называемый Simultaneously Margin of Error:

$$SME = t_{(1-\alpha^*/2, df)} \cdot SD_1^Y, \quad (10)$$

где t – критерий Стьюдента для уровня значимости $\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$. При этом любой эффект, который превышает ME, но ниже SME, рассматривается как «возможно значимый», а эффект, который превышает SME, как «значимый». Значение $t_{(1-\alpha^*/2, df)}$ можно определять в Excel с помощью функции =СТЮДЕНТ.ОБР(значение $1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$; значение m).

Таблица 6.

Значения Rankit в зависимости от порядкового номера (№) абсолютного эффекта фактора $|E_{X_i}^Y|$ в таблице для построения графика Half-normal probability plot (рисунок 1) и количества строк N в плане Плаккетта – Бермана [16]

Порядковый номер эффекта	Rankit		
	Для N=8	Для N=12	Для N=16
1	0,09	0,06	0,04
2	0,27	0,17	0,12
3	0,46	0,29	0,21
4	0,66	0,41	0,29
5	0,90	0,53	0,38
6	1,21	0,67	0,47
7	1,71	0,81	0,57
8		0,98	0,67
9		1,19	0,78
10		1,45	0,89
11		1,91	1,02
12			1,18
13			1,36
14			1,61
15			2,04

При исследовании робастности методик рекомендуется рассматривать как значимые те факторы, у которых абсолютное значение эффекта превышает ME [16]. Это повышает надежность исследования робастности методик, хотя и увеличивает вероятность того, что как значимый будет рассмотрен возможно значимый эффект фактора.

Значимые эффекты факторов определяют по таблице 5 таким же образом, как и в примере в разделе 5.3, но абсолютные значения эффектов факторов сравнивают со значениями ME для $\alpha=0,05$ (P=95%), а также для $\alpha=0,1$ (P=90%). Из таблицы 5 видно, что, во-первых, всегда $ME < SME$, во-вторых, при одинаковом значении α для одних откликов $ME > E_{X, critical}^Y$, а для других, наоборот, $E_{X, critical}^Y > ME$. Это указывает на необходимость использования нескольких критериев при исследовании робастности хроматографических методик определения примесей.

Для визуального представления/оценки значимости эффектов факторов при применении алгоритма Донга целесообразно использовать график Half-normal probability plot (рисунок 1, нижний график). Его можно построить с использованием таблицы, расположенной слева от графика. Отметим, что в таблице присутствуют только реальные факторы (нет фиктивных факторов). В соответствии с этой таблицей строят график зависимости абсолютных значений эффектов факторов $|E_X^Y|$ (расположенных по возрастанию) от значений Rankit (ранг; таблица 6) и наносят на этот график линию предела погрешности ME. Значимыми будут те факторы, у которых точки эффектов расположены выше линии ME. Для сравнения на рисунке 6 дополнительно нанесены еще 2 предела: SME и $E_{X, critical}^Y$ (критическое значение, основанное на t-критерии Стьюдента; раздел 5.3). Видно, что $SME \gg ME$, а ME (в этом примере, но не в общем случае) больше $E_{X, critical}^Y$.

5.5. Определение значимых факторов методом дисперсионного анализа (ANOVA) и фиктивных факторов [13]

Этот способ не имеет существенного преимущества перед методом с использованием t-критерия Стьюдента [11], поэтому не будем на нем останавливаться. Отметим только, что у значимых факторов расчетное значение F-критерия больше, чем табличное (критическое) значение F-критерия для заданого уровня значимости α , а расчетная оценка уровня значимости p меньше, чем α .

5.6. Определение значимых факторов с использованием теста рандомизации (Randomization test).

Этот тест подробно рассмотрен в [22]. Он связан с перебором всевозможных комбинаций полученных результатов, требует большого объема вычислений, но на современных компьютерах это занимает немного времени. Преимуществом теста рандомизации является то, что он не связан с каким-то заданным распределением случайной величины, его эффективность в оценке значимых факторов высокая, сравнимая с методом Донга; при этом тест рандомизации в некоторых случаях указывает на большее количество значимых факторов по сравнению с методом Донга, а в других случаях – наоборот. Однако в общем случае авторы публикации [22] все-таки отдают предпочтение методу Донга.

6. Статистическая оценка допустимых пределов изменения для значимых факторов [16]

После того как установлены значимые факторы, для реальных значимых факторов проводят оценку их допустимых пределов изменения относительно номинального значения, а также допустимых границ изменения.

Допустимый предел изменения:

$$\Delta X = \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| \cdot E_{X, critical}^Y}{2|E_X^Y|} \tag{11}$$

Допустимая нижняя граница:

$$X_0 - \Delta X. \quad (12)$$

Допустимая верхняя граница:

$$X_0 + \Delta X, \quad (13)$$

где X_0 , $X_{(1)}$ и $X_{(-1)}$ – реальные значения фактора X для уровней (0), (1) и (-1) соответственно; E_X^Y – эффект фактора X по отклику Y (формула 2); $E_{X,critical}^Y$ – критическое значение эффекта фактора X по отклику Y (формула 5) или аналогичное ему по смыслу значение по методу Донга – МЕ (формула 9).

Пример. Согласно таблице 5 для уровня значимости $\alpha=0,05$ имеется один значимый фактор – V_{max} для отклика Rs . Для этого фактора $|E_X^Y| = 0,357$;

$E_{X,critical}^Y = 0,291$; $X_0=90,0\%$, $X_{(1)}=91,8\%$; $X_{(-1)}=88,2\%$. Подстановка этих значений в формулы (11), (12) и (13) дает допустимый предел изменения $\Delta V_{max}=\pm 1,47\%$ и, соответственно, допустимые границы $90,0\pm 1,47\%$. Для $ME=0,412$ получается больший допустимый предел изменения $\Delta V_{max}=\pm 2,08\%$ и более широкие допустимые границы $90,0\pm 2,08\%$. Берем меньшее значение допустимого предела изменения $\pm 1,47\%$ и проверяем, что суммарная погрешность мерной посуды, используемой для приготовления подвижной фазы (ПФ), плюс точность смешения ПФ в хроматографе (в %) не превышает $\Delta V_{max}=\pm 1,47\%$. Если все-таки превышает, то для приготовления ПФ рекомендуется использовать взвешивание вместо смешения объемов [1].

7. Статистическая оценка допустимых пределов изменения откликов для наихудших случаев с целью уточнения требований к пригодности хроматографической системы

В [16] для статистической оценки допустимых пределов изменения откликов предложено использовать **наихудшие случаи (the worst-case situation)** – комбинации факторов, дающих наихудшее значение отклика на основании исследования робастности методики, например наихудшее разрешение Rs , наибольшее значение коэффициента асимметрии и т.д. При этом для определения наихудших условий рассматриваются статистически значимые факторы при $\alpha=0,05$ и те, которые близки к ним (значимы при $\alpha=0,1$). Факторы, которые статистически незначимы при $\alpha=0,1$, считаются неважными и их эффекты, как полагают, происходят только из экспериментальной ошибки.

Теоретический расчет (прогноз) допустимых пределов изменения откликов. Для теоретического расчета допустимых пределов изменения откликов применяют формулу:

$$Y_{worst-case,j} = b_0 + \frac{E_{F_1}}{2} \cdot F_1 + \frac{E_{F_2}}{2} \cdot F_2 + \dots + \frac{E_{F_k}}{2} \cdot F_k, \quad (14)$$

где $Y_{worst-case,j}$ – прогнозируемое значение рассматриваемого отклика Y_j для наихудшего случая, b_0 – средний результат для этого отклика (the average design result), то есть среднее значение в столбце отклика Y_j , E_{F_i} – эффект фактора i и F_i – соответствующий ему уровень (-1) или (+1) или (0) для худшего из экспериментально полученных значений Y_j . Множитель F_i для значимых факторов равен (-1) или (+1) в соответствии с матрицей планирования экспериментов, а для незначимых факторов значения (-1) или (+1) в матрице планирования экспериментов заменяются на (0): $F_i=0$ (то есть считается, что незначимые факторы не влияют на наихудшие случаи). Теоретический расчет допустимых пределов изменения откликов по формуле (14) привлекателен. Однако наш и литературный опыт (например, [27]) показывает, что результат теоретического расчета может иногда существенно отличаться от результата экспериментальной оценки допустимого предела изменения отклика.

Пример. В таблице 5 для отклика Rs значимыми факторами на уровнях $\alpha=0,05$ и $\alpha=0,1$ являются V_{max} ($E_{F_i} = -0,357$) и Column ($E_{F_i} = -0,210$) – колонки с одинаковым сорбентом, но упакованные разными производителями. Среднее значение эффектов для отклика Rs в таблице 4 $b_0=2,58$, а худшее (наименьшее) значение для отклика Rs равно 2,14; это значение соответствует строке 8 в матрице Плакетта – Бермана, а в строке 8 у значимых факторов – V_{max} и Column уровни равны +1, то есть для них $F_i=+1$. Для остальных факторов $F_i=0$. Подставив данные для E_{F_i} и F_i в формулу (14), получаем $2,58 - 0,357/2 - 0,214/2=2,29$. Так как $2,29 > 2,14$ (худший экспериментальный результат), это указывает на плохую точность прогноза наихудшего случая для отклика Rs .

Экспериментальная оценка допустимых пределов изменения откликов. В матрице откликов – таблица 5 – помечают те отклики, для которых имеются статистически значимые факторы при $\alpha=0,05$, и те, которые близки к ним – значимы при $\alpha=0,1$. Для каждого из таких откликов в таблице 5 находят наихудший случай, например для Rs это значени 2,14 в восьмой строке. Ему соответствует такая же строка в матрице планирования экспериментов (таблица 3). В этой строке для всех незначимых факторов по рассматриваемому отклику заменяют уровни +1 или -1 на 0 и получают условия эксперимента (хроматографирования) для наихудшего случая по отклику Rs :

λ	Flow	V_{max} , %	V_{max} , %	pH	Column	T, °C	C_{Buff}
0	0	0	1	0	1	0	0

При этой комбинации факторов, выраженных в фактических значениях, проводят не менее 3 параллельных определений отклика и вычисляют допустимый предел изменения отклика в соответствии с формулами.

В случае нижней границы:

$$Y_L = \bar{Y}_{\text{worst-case}, j} - t_{\alpha, n-1} \frac{SD_j}{\sqrt{n}} \quad (15)$$

В случае верхней границы:

$$Y_U = \bar{Y}_{\text{worst-case}, j} + t_{\alpha, n-1} \frac{SD_j}{\sqrt{n}}, \quad (16)$$

где $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j}$ и SD_j соответственно среднее значение и стандартное отклонение отклика Y_j для наихудшего случая; $t_{\alpha, n-1}$ – односторонний критерий Стьюдента для 95%-й доверительной вероятности; n – число параллельных определений. Для отклика R_s в нашем примере $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j} = 2,14$, $t_{\alpha, n-1} = 2,92$, $SD_j = 0,04$. Подставив эти значения в формулу (15), получаем $Y_L = 2,07$. Это значение удовлетворяет требованию к R_s по методике ($R_s \geq 2,0$), и, следовательно, нет необходимости в коррекции требования к разрешающей способности хроматографической системы. В то же время экспериментальное значение R_s для наихудшего случая 2,07 существенно меньше теоретического расчета 2,29. В связи с этим и со сказанным выше рекомендуем не ограничиваться теоретической оценкой допустимых пределов изменения откликов.

Примечание. Если для отклика отсутствуют значимые эффекты и, следовательно, отсутствуют упомянутые выше наихудшие случаи, то его допустимые пределы изменения можно определять аналогичным образом, проводя параллельные определения при номинальных значениях всех факторов (то есть при условиях по валидируемой методике) и подставляя в формулы (15) или (16) среднее значение отклика \bar{Y}_j вместо $\bar{Y}_{\text{worst-case}, j}$ [16].

8. Компьютерные программы для статистической обработки данных и планирования экспериментов, которые могут быть использованы для определения значимых факторов

В публикации [29] дан обзор по применению математического планирования экспериментов в хроматографии, а также даны ссылки на 15 основных компьютерных программ, которые были применены в хроматографических исследованиях. Отметим, что некоторые из этих программ могут быть использованы для определения значимых факторов. Среди них можно выделить: STATISTICA (StatSoft) – <http://statsoft.ru/resources/support/download.php>, версия для Windows –

<http://soft.mydiv.net/win/download-STATISTICA.html>; STATGRAPHICS (Statpoint Technologies) – <http://www.statgraphics.com/> и SPSS (IBM) – <http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/>.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пошагово рассмотрено исследование робастности хроматографических методик с использованием планов Плакетта – Бермана. При этом даны пояснения, рекомендации и примеры, что чрезвычайно важно для практического применения метода планирования экспериментов при валидации робастности хроматографических методик. Основное внимание уделено определению значимых факторов, то есть тех, которые потенциально могут быть критическими для откликов. Показано, что для повышения надежности исследования робастности методик определения примесей следует использовать не менее двух способов оценки значимых факторов.

Если у валидируемой методики все факторы высокого и среднего риска [1] являются незначимыми, то она *a priori* является робастной.

Если имеются значимые факторы для некоторых откликов, то выполняют следующие действия:

- для значимых факторов вычисляют допустимые пределы их изменения и при необходимости учитывают их в методике (см. пример в разделе 6);
- для откликов, для которых имеются значимые факторы, определяют наихудший случай и на его основании – допустимые пределы изменения отклика [формулы (15) и (16)]. Если эти допустимые пределы укладываются в исходные требования к пригодности хроматографической системы, то методика робастная. Если нет, то рассматривают возможность коррекции допустимого предела изменения отклика в требованиях к пригодности хроматографической системы в соответствии со значениями, полученными по формулам (15) и (16). Если эта коррекция невозможна, то делают вывод о необходимости доработки методики.

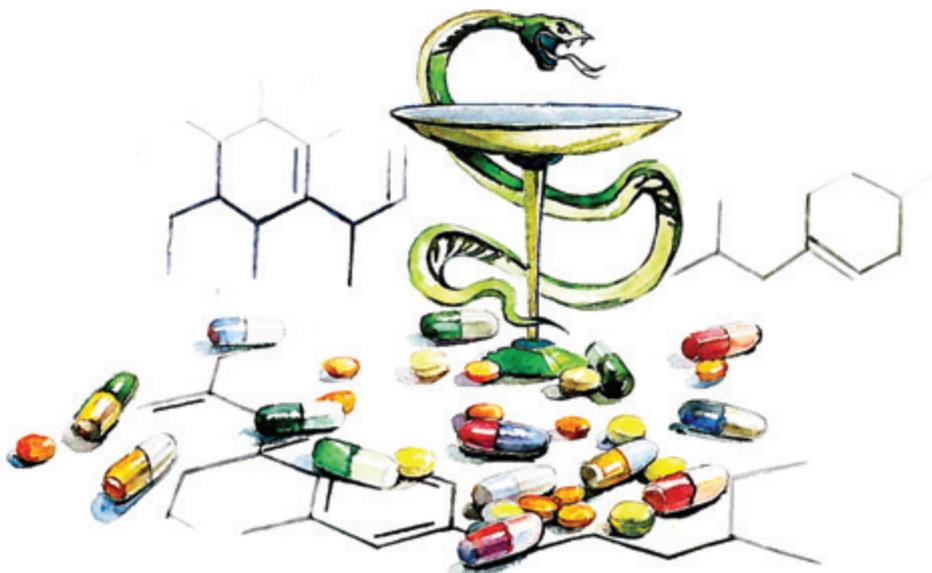
ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Исследование робастности при валидации методик ВЭЖХ и УЭЖХ: современный подход, включающий анализ рисков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 140–153. [Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Issledovanie robastnosti pri validatsii metodik VEZhKh i UEZhKh: sovremenniy podkhod, vkluchayushchii analiz riskov // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Robustness study in the validation of HPLC and HPLC techniques: a modern approach, including risk analysis // Development and registration of drugs]. 2018. № 1(22). P. 140–153.]
2. Vander Heyden Y., Nassart D. L. Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry // Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products / Ed. by Hendriks M.W.B., de Boer J.H., Smilde A.K.. – Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1996. P. 79–147.

3. *Montgomery D. C.* Design and analysis of experiments. 5th ed. – N.Y.: John Wiley & Sons, Inc. 2001. 684 p.
4. *Кононюк А. Е.* Основы научных исследований (Общая теория эксперимента). Кн. 2. – Киев. КНТ. 2010. 452 с. [Kononyuk A. E. Osnovy nauchnykh issledovaniy (Obshchaya teoriya eksperimenta). Kn. 2. Kiev. KNT. [Fundamentals of scientific research (General theory of the experiment). Book. 2.] – Kiev. CST. 2010. 452 p.]
5. *Ott R. L., Longnecker M.* An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. 6th Ed. – Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning. 2010. 1273 p.
6. *Эрмер Й., МакБ. Миллер Д. Х.* 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 Remer J., Miller J. H. – Wenhham: Wiley-VT Verlag GmbH & Co. Ka. 2005. 403 p.]
7. *Bartolucci A., Singh K. P., Bae S.* Introduction to Statistical Analysis of Laboratory Data. Chart 8. Robustness and Ruggedness. – John Wiley & Sons, Inc, 2015. 256 p.
8. *Ganorkara S. B., Dhumal D. M., Shirkhedkar A. A.* Development and validation of simple RP-HPLC-PDA analytical protocol for zileuton assisted with Design of Experiments for robustness determination // *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. V. 10. P. 273–282.
9. *Vander Heyden Y., Luypaert K., Hartmann C. et al.* Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopoeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental design and statistical interpretations // *Analytica Chimica Acta*. 1995. V. 312. P. 245–262.
10. *Fabre H.* Robustness testing in liquid chromatography and capillary electrophoresis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996. V. 14. P. 1125–1132.
11. *Cuadros Rodriguez L., Blanc Garcia R., Garcia Campana A. M., Bosque Sendra J.M.* A new approach to a complete robustness test of experimental nominal conditions of chemical testing procedures for internal analytical quality assessment // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998. V. 41. P. 57–68.
12. *Jimidar M., Niemeijer N., Peeters R., Hoogmartens J.* Robustness testing of a liquid chromatography method for the determination of vorozole and its related compounds in oral tablets // *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 1998. V. 18. P. 479–485.
13. *Vander Heyden Y., Jimidar M., Hunda E. et al.* Determination of system suitability limits with a robustness test // *J. Chromatography A*. 1999. V. 845. P. 145–154.
14. *Hund E., Vander Heyden Y., Haustein M. 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.
15. *Ragonese R., Mulholland M., Kalman J.* Full and fractional experimental designs for robustness in the high-performance liquid chromatographic analysis of co-deine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation // *J Chromatogr A*. 2000. V. 870. P. 45–51.
16. *Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J. et al.* Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2001. V. 24. № 5–6. P. 723–753.
17. *Hund E., Massart D. L., Smeyers-Verbeke J.* Robust regression and outlier detection in the evaluation of robustness tests with different experimental designs // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V. 463, P. 53–73.
18. *Hund E., Vander Heyden Y., Massart D. L., Smeyers-Verbeke J.* 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.
19. *Jimidar M., Van Ael W., De Smet M., Coccaerts P.* Method Validation and Robustness Testing of an Enantioselective CE Method for Chemical Quality Control, LC-GC Europe, April, 2002. P. 2–9.
20. *Yong-Guo Li, Hong Liu, Y. Vander Heyden et al.* Robustness tests on the United States Pharmacopoeia XXVI HPLC assay for ginsenosides in Asian and American ginseng using an experimental design // *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 536. P. 29–38.
21. *Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y.* The variance of screening and supersaturated design results as a measure for method robustness // *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 544. P. 28–279.
22. *Dejaegher B., Capron X., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y.* Randomization tests to identify significant effects in experimental designs for robustness testing // *Analytica Chimica Acta*. 2006. V. 564. P. 184–200.
23. *Dejaegher B., Dumarey M., Capron X., Bloomfield M.S., Vander Heyden Y.* Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 595. № 1–2. P. 59–71.
24. *Jimidar M. I., Heylen P., De Smet Ma.* Method Validation // *Separation Science and Technology*. 2007. V. 8. P. 441–458.
25. *Durden D. A.* Using Plackett – Burman partial factorial designs for method robustness testing. By D. A. Durden. Canadian Food Inspection Agency Calgary Laboratory 3650 36 St NW Calgary, AB. http://www.traceorganic.com/2007/presentations/DaveDurden_Using%20Plackett%20Burman%20partial%20factorial%20designs%20for%20method.pdf (accessed 09.08.2018).
26. *Dejaegher B., Vander Heyden Y.* Robustness testing of CE methods // *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis* / Ed. by Ahuja S. and Jimidar M.I. – Elsevier Inc., 2008. V. 9.
27. *Mašković M., Jančić-Stojanović B., Malenović A. et al.*, Assessment of Liquid Chromatographic Method Robustness by Use of Plackett – Burman Design // *Acta Chromatographica*. 2010. V. 22. № 2. P. 281–296.
28. *Chakravarthy V. K., Kishore Babu G. K., Dasu R. L. 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> (accessed 09.08.2018).
29. *Brynn Hibbert D.* Experimental design in chromatography: A tutorial review // *J. Chromatography B*. 2012. V. 910. P. 2–13.
30. *Stojanovic B. J., Rakic T., Slavkovic B. et al.* Systematical approach in evaluation of LC method for Determination of raloxifene hydrochloride and its impurities employing experimental design // *J. Pharm. Analysis*. 2013. V. 3. № 1. P. 45–52.
31. *Luciana F. Oliveira, Soraia C. G. N. Braga, Paulo R. Filgueiras et al.*, Assessment of robustness on analysis using head space solid-phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography through experimental designs // *Talanta*. 2014. V. 129. P. 303–308.
32. *Schmidt A. H., Stanica M., Molnár I.* In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling–Case study pramipexole // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2014. V. 91. P. 97–107.
33. *Mokhtara H. I., Abdel-Salamb R. A., Haddab G.M.* Development of a fast high performance liquid chromatographic screening system for eight antidiabetic drugs by an improved methodology of in-silico robustness simulation // *J. Chromatography A*. 2015. V. 1399. P. 32–44.
34. *Prafulla Kumar Sahu.* Definition of System Suitability Test Limits on the Basis of Robustness Test Results // *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2017. V. 8. № 2. P. 1–6. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/definition-of-system-suitability-test-limits-on-the-basis-of-robustness-testresults-2155-9872-1000363.php?aid=90748&view=mobile> (accessed 08.08.2018).
35. *Szerkusa O., Jacynaa J., Gibasb A. et al.* Robust HPLC–MS/MS method for levofloxacin and ciprofloxacin determination in human prostate tissue // *J. Pharm. and Biomed. Analysis*. 2017. V. 132. P. 173–183.
36. *How to Draw a Normal Probability Plot By Hand.* Url: <http://www.statisticshowto.com/normal-probability-plot/> (accessed 09.08.2018).
37. *Dong F.* On the identification of active contrasts in unreplicated fractional factorials // *Statistica Sinica*. 1993. V. 3. P. 209–217.

XI Аптечный Саммит

РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РИТЕЙЛА В РОССИИ И СНГ



Приглашаем вас принять участие в ключевой осенней встрече всей российской аптечной розницы – XI Аптечном саммите «Развитие фармацевтического ритейла в России и СНГ», который пройдет 5 октября в Москве.

ЗНАКОВАЯ ВСТРЕЧА ГОДА!

- **450+ делегатов.** ТОП 100 (и не только) российских аптечных сетей. ТОП 20 дистрибуторов.
- **БЕЗ ЦЕНЗУЫ:** на сцене только главные трендсеттеры российской фарм. розницы.
- **3D ОБЗОРЫ.** Драйверы роста федеральных сетей, региональных аптек, дистрибуции.
- **5 дискуссий; 2 интервью; 2 круглых стола.**
- **ВСЕ федеральные округа** + аптечные сети из **СНГ** и дальнего зарубежья

Благодаря рекомендациям наших участников нам удастся собирать по-настоящему качественный состав аудитории, состоящий из владельцев и генеральных директоров крупнейших аптечных сетей. Вместе с ними мы откровенно обсуждаем стратегии выживания на высоко конкурентном рынке!

Полная информация на сайте: infor-media.ru и у Елены Проненко по тел.: +7 495 995-80-04, доб. 1272, или по e-mail: e.pronenko@infor-media.ru

УДК 547.458

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ N-АРИЛИДЕНГИДРАЗИДОВ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Д. Н. Косарева^{1*}, Т. И. Тарадейко¹, С. Н. Галашева¹, Е. П. Ананьева¹,
А. А. Иозеп¹

Резюме. Изучена противобактериальная и противогрибковая активность продуктов взаимодействия гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты с 5-нитрофурфуолом и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеином. Активность синтезированных веществ определяли на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. У полученных соединений выявлено антибактериальное действие, сравнимое с фурацилином. Образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью.

Ключевые слова: N-арилиденгидразиды карбоксиэтилальгиновой кислоты, нитрофураны, антимикробная активность.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF N-ARILIDENHYDRAZIDE OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID

D. N. Kosareva^{1*}, T. I. Taradeyko¹, S. N. Galasheva¹, E. P. Ananieva¹, A. A. Iozep¹

Abstract. The antibacterial and antifungal activity of the products of the interaction of hydrazides of carboxyethyl alginic acid with 5-nitrofurfurool and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein was studied. The effect of analytical studies on the test-culture of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The test compounds showed antibacterial action comparable to the furacilin and high antifungal effect. Samples of acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein have high fungicidal and fungistatic activity.

Keywords: N-arilidenhydrazide of carboxyethylalginic acid, nitrofurans, antimicrobial activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

* адресат для переписки:

E-mail: kutkinadaria@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапевтические препараты нитрофуранового ряда обладают антимикробной активностью и применяются в медицинской практике для лечения инфекционных заболеваний. В настоящее время в связи с появлением новых антибиотиков применение нитрофуранов значительно снизилось. Тем не менее широкий спектр действия делает их одним из весьма распространенных лечебных средств, применяемых в урологии для лечения пиелонефритов, циститов и уретритов, вызываемых стафилококками, кишечными палочками, протееями и некоторыми другими бактериями (кроме синегнойной палочки). Нитрофураны высоко эффективны и при лечении различных инфекций желчевыделительных органов [1]. Следует особенно отметить комбинированное их применение со сходными по фармакологическим свойствам антибиотиками. Несовместимости при этих сочетаниях еще не отмечено, как и при комбинации с различными другими специфическими и неспецифическими лечебными препаратами (сыворотками, бактериофагами, биостимуляторами, витаминами и др.).

Основной проблемой при применении нитрофуранов является частое проявление побочных действий, а также отсутствие парентеральных лекарственных форм [1].

В литературе достаточно много примеров о введении в молекулу полисахарида противомикробных веществ с целью улучшения их биологических свойств (продолгование действия, снижение токсичности, изменение растворимости и некоторых других свойств). Изучена и активность полимерных аналогов фурацилина: 5-нитрофурфуриден- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и нативной альгиновой кислот [2]. Исследования показали, что синтезированные соединения в целом не снижают противомикробный эффект, а в ряде случаев увеличивают его в 10–100 раз, а также проявляют фунгицидный и фунгистатический эффект в отношении *C. albicans*. Авторы предполагают, что увеличение размера «вставки» (углеродной цепи) между полимером и нитрофурановым фрагментом повышает антимикробное действие синтезированных образцов.

В связи с этим целью нашей работы был синтез и изучение антимикробной активности N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты, в которых углеродная цепь между полимером и нитрофурановым фрагментом на $(-CH_2-)$ -группу больше, чем в гидразидах карбоксиметилальгиновой кислоты, и на $(-C_2H_4-)$ -группу больше, чем в гидразидах альгиновой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acros Organics, США). При помощи гель-хроматографии на колонке K-16/40 («РЕАНАЛ», Венгрия) (1,6×40 см) с сефадексом марки G-200 (CAS № 9041-36-5, Sigma Aldrich, США) было установлено [3], что она состоит из полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200000 Да, которые в целом сохраняются после алкилирования. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97%, а после очистки водной щелочью – 100%.

Синтез N-бензилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

100 мг гидразида карбоксиэтилальгиновой кислоты растворяли в 1 мл 0,2 н. раствора уксусной кислоты, а затем добавляли раствор альдегида (1–5 моль на моль гидразидных групп) в 1 мл этанола. Реакционную массу перемешивали в плоскодонной конической колбе на магнитной мешалке AREC.T (VELP SCIENTIFICA, Италия) в течение 1 ч при температуре 40 °С, после чего полисахарид осаждали этиловым спиртом. Полученный осадок растворяли в 2 мл дистиллированной воды, водной щелочью доводили pH до 8, продукт осаждали, центрифугировали в течение 3 минут при 8 тыс. оборотов в минуту и промывали спиртом. Затем сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) в течение 4 ч без нагрева.

Строение полученных соединений доказано ИК- и УФ-спектроскопией [4].

Метод определения антимикробной активности

Противомикробную активность изучали на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм ATCC 6538-P, *Escherichia coli* штамм ATCC 25922, а также *Candida albicans* штамм ATCC 885-635. Изучение антимикробной активности проводили методом двухкратных серийных разведений в жидких питательных средах: для антибактериального действия использовали мясо-пептонный бульон, а для определения противогрибкового действия – среду Сабуро.

Исходные растворы N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты готовили в воде.

Для приготовления взвеси тест-микроорганизмов использовали двухсуточные культуры, выращенные на мясопептонном агаре и на плотной питательной среде Сабуро для дрожжевых грибов. Взвесь готовили по стандарту мутности Мак-Фарланда ($2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), затем суспензию разводили и вносили по 0,1 мл в каждую пробирку. Концентрация микробных клеток в опытах составляла 10^5 КОЕ на мл для бактерий и 10^4 КОЕ на мл для дрожжевых грибов.

Время инкубации для *St. aureus*, *E. coli* – 18–24 ч при 37 °С, для *C. albicans* – 24–48 ч при 24 °С. В качестве контроля использовали питательную среду без образца с внесенной исследуемой культурой. Наличие или отсутствие роста тест-микроорганизмов оценивали визуально по помутнению среды. Для определения микрообидного и микростатического действия проводили высеив на плотные питательные среды. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающего задержку размножения (МИК_{ст}) или гибель тест-культуры (МИК_д). Активность N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты выражали в пересчёте на содержание введённого фрагмента. В качестве образца сравнения был использован препарат ряда производных нитрофурана – фурацилин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами микробиологического исследования являлись N-арилиденгидразиды карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК) с различными степенями замещения, полученные по схеме, разработанной в СПХФУ авторами статьи [4].

Амид карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК) (**2**) получали алкилированием альгиновой кислоты (**1**) акриламидом в диоксане в присутствии тетраметилламмония гидроксида, как описано в работе [5]. Гидразид КЭАК (**3**) синтезировали по разработанной ранее методике [6] нагреванием образовавшегося амида с гидразином гидратом при 40 °С в течение 12 ч.

Для получения гидразонов (**4**) к натриевой соли гидразида в уксусной кислоте прибавляли 1-5-кратный избыток этанольного раствора 5-нитрофурурола или β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина, реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 1 ч [4]. Продукт осаждали этиловым спиртом, переосаждали из воды этанолом и сушили в вакууме без нагрева в течение 4 ч.

Синтезированные вещества характеризовали процентным содержанием 5-нитрофуранового фрагмента. Все синтезированные образцы хорошо растворимы в воде в отличие от препаратов нитрофуранового ряда, что облегчает их дальнейшее использование.

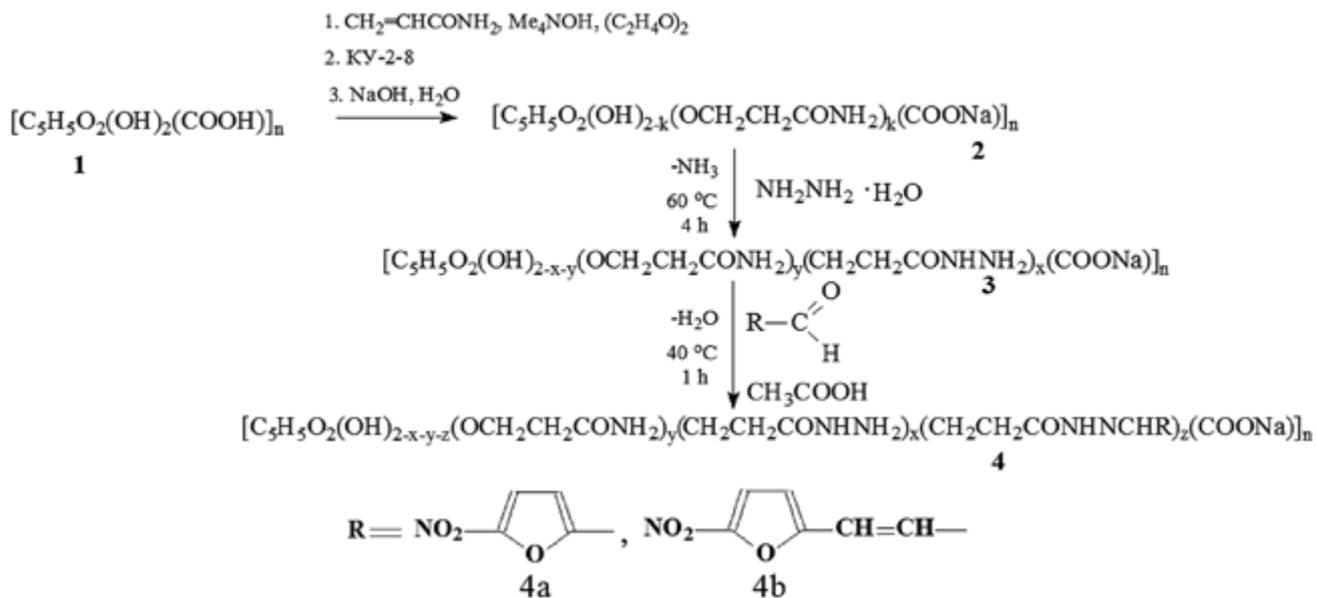


Рисунок 1. Схема химической модификации альгиновой кислоты

Микробиологический анализ исходных гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты, на основе которых были синтезированы полимерные ацилгидразоны биологически активных альдегидов, показал, что данные соединения не подавляют рост выбранных тест-микроорганизмов.

Введение в молекулу карбоксиэтилальгиновой кислоты 5-нитро-2-фурильного фрагмента привело к появлению у полисахарида антимикробной активности, однако её спектр действия и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) несколько отличаются от активности фурацилина (таблица 1). Так, синтезированные гидразоны 5-нитрофурафура обладают микростатическим эффектом в отношении *St. aureus*, сопоставимым с препаратом сравнения, а вот микробицидное действие снижается от 4 до 10 раз. Они неактивны в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli*, зато обладают слабо выраженным противогрибковым действием в отношении *C. albicans*. Их фунгистатическая концентрация (МИК_{СТ}) до 4,5 раз ниже, чем фурацилина. Кроме того, образцы проявляют слабую фунгицидную активность, которая отсутствует у препарата сравнения.

Синтезированные образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина оказались значительно более активными, чем ацилгидразоны 5-нитрофурафура. Они имеют бактерицидный и бактериостатический эффект в отношении *St. aureus*, превосходящий препарат сравнения в 2 раза (рисунок 2). В отношении *E. coli* данные соединения обладают меньшей активностью (МИК_Ц=7,2 мкг/мл), чем фурацилин (МИК_Ц=5,7 мкг/мл), при этом пропадает статический эффект. В отличие от фурацилина, который обладает только слабым фунгистатическим действием, синтезированные

нами полимеры проявляют высокую противогрибковую активность по отношению к *C. albicans*, фунгистатическое и фунгицидное действие которых достигает 1,5 и 3,0 мкг/мл соответственно (рисунок 3).

Таблица 1.

Антимикробная активность N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

Образец	Содержание активного вещества, масс. %	Тест-микроорганизмы					
		<i>St. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
		МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл	МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл	МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл
Гидразид КЭАК		Неактивен в отношении выбранных тест-культур					
Фурацилин		2,8	5,7	2,8	5,7	>500	-
4a	8,1	2,5	20,3	Неактивны в отношении <i>E. coli</i>		81	162
	9,3	2,8	23,3			93	186
	11,4	7,2	28,5			114	228
	12,8	16,0	32,0			128	256
	13,8	25,6	51,2			138	276
4b	11,6	0,9	1,9	-	7,2	1,5	3,0
	13,2	1,0	2,0	-	6,9	3,4	6,9
	13,3	1,5	3,1	-	6,9	3,8	7,6
	13,4	1,9	3,8	-	6,9	3,6	7,3
	14,1	1,8	3,6	-	6,9	3,5	6,9

Возможно, высокая противогрибковая активность связана с изменением транспорта активного вещества в микробную клетку либо с наличием этениленового (-CH=CH-) фрагмента, который присутствует также в

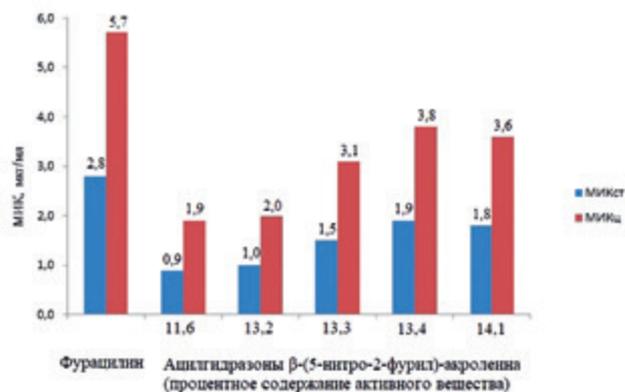


Рисунок 2. Бактериостатическое и бактерицидное действие ацилгидразонов β-(5-нитрофурил)-акролеина по отношению к *St. aureus*

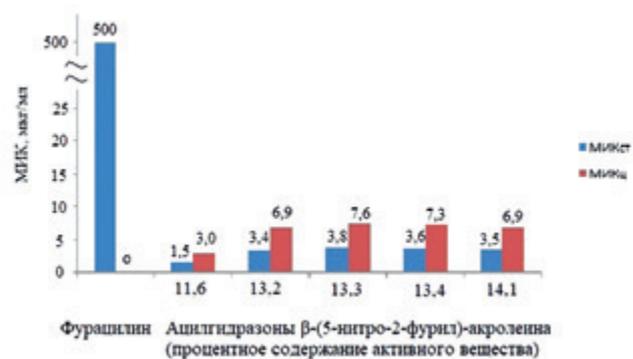


Рисунок 3. Фунгистатическое и фунгицидное действие ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *C. albicans*

нитрофурилене. Данный препарат обладает высокой фунгистатической активностью в отношении патогенных грибов, сочетающейся с выраженным антибактериальным действием, но из-за своей токсичности снят с регистрационного учета. В связи с этим можно предположить, что антимикотическая активность синтезированных образцов, так же как и у нитрофурилена, обусловлена ингибирующим действием на ферменты, участвующие в клеточном дыхании грибов.

При исследовании активности полимерных гидразонов 5-нитрофурурола и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина оказалось, что с увеличением содержания нитрофуранового фрагмента в полисахариде повышается минимальная ингибирующая концентрация. Эта закономерность прослеживается в отношении всех тест-микроорганизмов. Например, при увеличении в гидразонах β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина содержания активного вещества с 11,6 до 14,1% МПК₅₀ повышается с 1,9 до 3,6 мкг/мл в отношении *St. aureus* и с 3,0 до 6,9 мкг/мл в отношении *C. albicans*. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае 5-нитрофуруриленгидразидов карбоксиметилхитина [7] в отношении бактерий *St. aureus* и *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные исследования показали, что полученные нами полимерные гидразоны 5-нитрофурурола и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают антимикробной активностью и в отличие от препаратов нитрофуранового ряда хорошо растворимы в воде.
2. Синтезированные образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В. Г. Клиническая фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015. 1024 с. [Kukes V. G. Klinicheskaya farmakologiya. [Clinical Pharmacology.] – М.: GEOTAR-Media. 2015. 1024 s.]
2. Серебренникова Е. С., Давыдова В. Л., Гурина С. В., Иожен А. А. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. № 4. С. 60–62. [Serebrennikova E. S., Davydova V. L., Gurina S. V., Iozep A. A. Izuchenie antimikrobnoy aktivnosti nekotorykh proizvodnykh al'ginovoi kisloty // Problemy meditsinskoj mikologii. [The study of the antimicrobial activity of some alginic acid derivatives // Problems of Medical Mycology.] 2013. T. 15. № 4. S. 60–62.]
3. Серебренникова Е. С., Мороз М. С., Черёмушкин А. И., Иожен А. А. Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми N-нуклеофилами // Бултеровские сообщения. 2012. Т. 31. № 7. С. 18–23. [Serebrennikova E. S., Moroz M. S., Cheremushkin A. I., Iozep A. A. Reaktsii karboksimetilal'ginovoi kisloty s nekotorymi N-nukleofilami // Butlerovskie soobshcheniya. [Reactions of carboxymethyl alginic acid with some N-nucleophiles // Butlerov Communications.] 2012. T. 31. № 7. S. 18–23.]
4. Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Кутькина Д. Н., Щенникова О. Б., Иожен А. А. Синтез N-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 2(23). С. 90–94. [Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Kut'kina D. N., Shchennikova O. B., Iozep A. A. Sintez N-arilidengidrazidov karboksietilal'ginovoi kisloty. [Synthesis of N-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid.] // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2018. № 2(23). S. 90–94.]
5. Тарадейко Т. И., Седелкина Т. М., Тарасова Т. А., Иожен А. А. Алкилирование альгиновой кислоты акриламидом // ЖОХ. 2016. Т. 86. Вып. 8. С. 1345–1349. [Taradeiko T. I., Sedelkina T. M., Tarasova T. A., Iozep A. A. Alkilirovaniye al'ginovoi kisloty akrilamidom. [Alkylation of alginic acid with acrylamide.] // ZhOkh. 2016. T. 86. Vyp. 8. S. 1345–1349.]
6. Тарадейко Т. И., Седелкина Т. М., Галашева С. Н., Иожен А. А. Синтез гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 3(20). С. 110–114. [Taradeiko T. I., Sedelkina T. M., Galasheva S. N., Iozep A. A. Sintez gidrazidov karboksietilal'ginovoi kisloty [Synthesis of carboxyethylalginic acid hydrazides.] // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2017. № 3(20). S. 110–114.]
7. Дударев В. Г., Тихомирова О. М., Иожен А. А. Синтез и противомикробная активность производных карбоксиметилхитина // Хим.-фарм. журнал. 2013. Т. 47. № 1. С. 32–35. [Dudarev V. G., Tikhomirova O. M., Iozep A. A. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost' proizvodnykh karboksimetilkhitina [Synthesis and antimicrobial activity of carboxymethyl-chitin derivatives.] // Khim.-farm. zhurnal. 2013. T. 47. № 1. S. 32–35.]

УДК 615.015.6; 615.211, 615.212, 615.214; 615.11

КРИТЕРИИ ВЫБОРА СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ АНАЛЬГЕТИКОВ И ДРУГИХ ЛЕКАРСТВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

А. В. Соснов^{1,3*}, Ф. М. Семченко¹, В. Н. Тохмахчи¹, А. А. Соснова¹,
М. И. Власов¹, А. С. Радилов², Д. В. Криворотов²

Резюме. Глобальный опиоидный кризис требует смены парадигмы медицинского использования опиоидов, разработки методологии снижения незаконного потребления наркотиков, разработки средств лечения зависимости и антидотов. В США осуществляется программа HEAL Initiative под научным руководством NIH и при активном участии FDA, CDC и военно-медицинских структур. Ситуация в РФ характеризуется сочетанием высокого незаконного потребления опасных опиоидов с крайним дефицитом мощных анальгетиков, средств купирования наркотической зависимости и передозировки, а также примитивным ассортиментом лекарственных форм. Отсутствует не только разработка инновационных субстанций и препаратов сильных анальгетиков и антидотов, но и компетентный анализ предметной области и видение путей развития. Проведенный анализ данных показывает необходимость замены части традиционно используемых, в основном природных и полусинтетических, наркотических анальгетиков (обладающих низким терапевтическим индексом, неудовлетворительной фармакокинетикой и выраженным побочным действием), перспективными синтетическими опиоидами и ненаркотическими анальгетиками. Обосновано использование пролекарств, синергических комбинаций, конъюгатов и солекарств. Перспективные для разработки широкого спектра улучшенных лекарственных форм соединения и субстанции должны сочетать высокую анальгетическую активность, высокий терапевтический индекс, минимальные значения T_{max} и $t_{1/2k_{e0}}$, положительные значения LogBB , коэффициент распределения в интервале $1 < \log D_{7,4} < 3$. Данное сочетание свойств необходимо для эффективности и безопасности ЦНС-специфичных лекарств, а также допускает разработку на их основе широкого спектра лекарственных форм (инъекционных и неинъекционных, быстродействующих и пролонгированных). В первую очередь целесообразна замена некоторых морально устаревших инъекционных и пероральных препаратов (особенно с быстрым и неконтролируемым высвобождением) быстродействующими трансмукозными лекарственными формами с заданными фармакокинетическими свойствами. Для анализа передового опыта, выработки стратегии в области сильнодействующих контролируемых лекарственных и ветеринарных средств (анальгетики, анестетики, антидоты и другие жизненно важные средства терапии), а также координации и контроля разработок и производства необходимо создание профильной компетентной структуры управления, сочетающей задачи медицинского обеспечения населения и личного состава силовых структур эффективными и безопасными препаратами.

Ключевые слова: анальгетик, опиоид, морфин, оlicerидин, аналоги фентанила, пролекарство, солекарство, опиоидный кризис, морфиновый эквивалент, терапевтический индекс, коэффициент распределения, фармакокинетика, неинъекционная лекарственная форма, антидот.

SELECTION CRITERIA OF COMPOUNDS FOR DEVELOPMENT OF HIGH-POTENT ANALGESICS AND OTHER CNS DRUGS

A. V. Sosnov^{1,3*}, F. M. Semchenko¹, V. N. Tohmahchi¹, A. A. Sosnova¹, M. I. Vlasov¹, A. S. Radilov², D. V. Krivorotov²

Abstract. The global opioid crisis requires a paradigm shift in medical use of opioids, the development of methodology to reduce illicit drug use, and development of drug addiction treatment and antidotes. USA target program – HEAL Initiative is implemented under the scientific guidance of NIH with active participation of FDA, CDC and military medicine institutions. The situation in Russian Federation is characterized by a combination of high illegal consumption of dangerous opioids with an extreme shortage of potent analgesics, drugs for treatment addiction and overdose and rudimentary choice of drug formulations. There isn't any development of innovative substances and preparations of strong analgesics and antidotes, but also a competent analysis of the subject area and vision of directions for the development. The data analysis shows need to replace some of traditionally used mostly natural and semi-synthetic narcotic analgesics (with low therapeutic index, unsatisfactory pharmacokinetics and severe side effects) to promising synthetic opioids and non-narcotic analgesics. Use of prodrugs, synergistic combinations, conjugates and co-drugs is justified. Prospective dosage forms of compounds and pharmaceutical preparations for development of wide range of improved therapeutics should combine: high analgesic activity, high therapeutic index, minimum values of T_{max} and $t_{1/2k_{e0}}$, positive values of LogBB , distribution coefficient $\log D_{7,4}$ in the interval from 1 to 3. This combination of key properties is necessary for effectiveness and safety of CNS-specific drugs and also allows development on their basis wide range of dosage forms (injectable and non-injectable drugs, fast-acting and prolonged drugs). First of all it is desirable to replace some obsolete injecting and oral preparations (especially with fast and uncontrolled release) to fast-acting transmucosal formulations with targeted pharmacokinetic properties. In order to analyze best practices, develop a strategy for highly effective controlled medicinal and veterinary drugs (analgesics, anesthetics, antidotes and other vital therapies) and coordinate their development and production it is necessary to create competent management structure combining the tasks of provision of civilian population and personnel of national defense agencies of effective and safe drugs.

Keywords: analgesic, opioid, morphine, oliceridine, fentanyl analogues, prodrug, co-drug, opioid crisis, morphine equivalent, therapeutic index, distribution coefficient, pharmacokinetics, non-injectable dosage form, antidote.

1 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), 111024, Россия, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 23

2 – ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России), 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, к. 93

3 – ФГБУН Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), 142432, Московская обл., г. Черноголовка, Северный пр., д. 1

1 – Federal State Unitary Enterprise «State Pharmaceutical Plant» (FSUE «GosZMP»), 23, sh. Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

2 – Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, 93, v. Kuz'molovskiy, Vsevolozhskiy district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, 1, Severnyy av., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: andrey.sosnov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Область средств купирования сильной боли исторически ассоциируется с использованием природных и полусинтетических наркотических анальгетиков. Однако наблюдается ряд трендов, которые в течение 5–7 лет приведут к принципиальному изменению структуры препаратов ведущих фармацевтических компаний в области средств лечения сильной и средней боли [1]. Целесообразность использования природных опиатов и некоторых традиционных полусинтетических и синтетических опиоидов для разработки новых препаратов анальгетиков ставится под сомнение с точки зрения фармацевтики, медицины, экономики, безопасности и социальных рисков [2]. С точки зрения производства и медицинского использования удобно иметь набор универсальных активных фармацевтических субстанций (АФС), действующих в низких дозах, обладающих высоким терапевтическим индексом (ТИ), эффективным распределением из кровотока в ткани ЦНС и быстрое действие. Это делает их пригодными для использования в составе максимально возможного спектра готовых лекарственных форм (ГЛФ) [2]. Большинство известных природных опиатов не удовлетворяет данным требованиям, что позволяет использовать только инъекционный и пероральный способ введения при участии (или под контролем) медперсонала. При этом желательно использование средств купирования побочных эффектов [3].

С точки зрения экономики и лекарственной безопасности производство сильнодействующих синтетических анальгетиков с высокими значениями морфинового эквивалента дозы (MED) наиболее рационально в рамках удовлетворения потребностей РФ. Фактическое преимущество синтетических и полусинтетических анальгетиков подтверждается данными динамики их медицинского использования и анализом тенденций исследований и разработок в развитых странах [1–5]. Использование именно синтетических анальгетиков может снизить зависимость РФ от импорта наркосодержащего сырья, сократить размеры дорогостоящих чистых производственных площадей, резко снизить объем используемых реагентов, растворителей и вспомогательных материалов по сравнению с производством эквивалентного количества лекарств на основе природного сырья [2, 5]. С точки зрения социальных рисков и общественной безопасности снижение объема оборота наркосодержащих веществ и прекурсоров уменьшает возможность злоупотребления – от незаконного немедицинского использования сырья и изделий до финансирования криминальных сообществ [6]. Перечисленные выше факторы актуальны для гармонизации медицинского использования наркотических средств. Нарушение баланса количества, разнообразия и безопасности выпускаемых сильнодействующих анальгетиков либо ведет к недостаточному фармацевтическому обеспе-

чению пациентов (текущая ситуация в РФ [7–9]), либо стимулирует развитие опиоидной эпидемии/кризиса (текущая ситуация в США [4, 11]).

ОПИОИДНЫЙ КРИЗИС В США КАК ДРАЙВЕР МОДЕРНИЗАЦИИ

Ситуация с избыточным потреблением опиоидов в Северной Америке признана угрозой здоровью населения. В США введено понятие «опиоидный кризис/эпидемия», что обусловлено гибелью более 68 тыс. чел. в течение года [11], причем более половины – от фетанила, его аналогов и героина [12]. Для решения проблемы с середины 2016 г. в США проводятся интенсивные работы в рамках финансируемой государством стратегической межведомственной программы под научным руководством Национальных институтов здравоохранения США (Helping to End Addiction Long-term Initiative, NIH HEAL Initiative) [13].

Именно угроза продолжения и развития опиоидной эпидемии делает актуальным изменение стратегии и существенный пересмотр структуры медицинского потребления сильнодействующих анальгетиков в развитых странах, что влечет существенное изменение структуры разработки, производства и клинического использования сильнодействующих анальгетиков, то есть происходит смена парадигмы в области терапии сильной и средней боли.

В рамках инициативы HEAL на базе NIH разрабатывается программа на основе использования фундаментальных знаний о неврологических путях, связанных с болью, механизмах формирования побочных эффектов, развития толерантности и зависимости [13]. Первый этап HEAL включает направления:

- предотвращение развития наркотической зависимости у пациентов через улучшение купирования боли, включая создание инновационных анальгетиков;
- улучшение лечения наркозависимых и антидотной терапии.

Программа FDA Opioids Action Plan [14] включает научно-технические и организационные мероприятия в области улучшения медицинского обеспечения при необходимости использования наркотических средств:

- создание экспертного консультативного комитета с задачей критического рассмотрения любых заявок на наркотические препараты, не содержащие технологических решений по снижению дозы наркотика и/или компонента, уменьшающего развитие зависимости и толерантности;
- разработку технологии информирования о безопасном использовании препаратов с быстрым высвобождением опиоидов и маркировку таких препаратов;

- усиление постмаркетинговых требований к контролю наркосодержащих препаратов;
- обновление стратегии оценки рисков, смягчения и купирования последствий опиоидной терапии (Risk Evaluation and Mitigation Strategy, REMS);
- увеличение доли инновационных препаратов с защитой от немедицинского использования (Abuse-deterrent formulations, ADFs);
- продвижение инновационных медицинских технологий и препаратов для купирования побочных эффектов лечения опиоидами и передозировки наркотиков;
- внедрение в клиническую практику мощных ненаркотических анальгетиков как безопасной альтернативы опиоидам;
- переоценку соотношения «польза – риск» для медицинского использования опиоидов с помощью экспертных оценок авторитетных академических, медицинских и инженерных профессиональных сообществ, в том числе и с точки зрения возможности злоупотребления.

На рисунке 1 представлены три временных этапа и три научных направления стратегии противодействия опиоидному кризису, предлагаемые NIH США [15]. Научные направления включают:

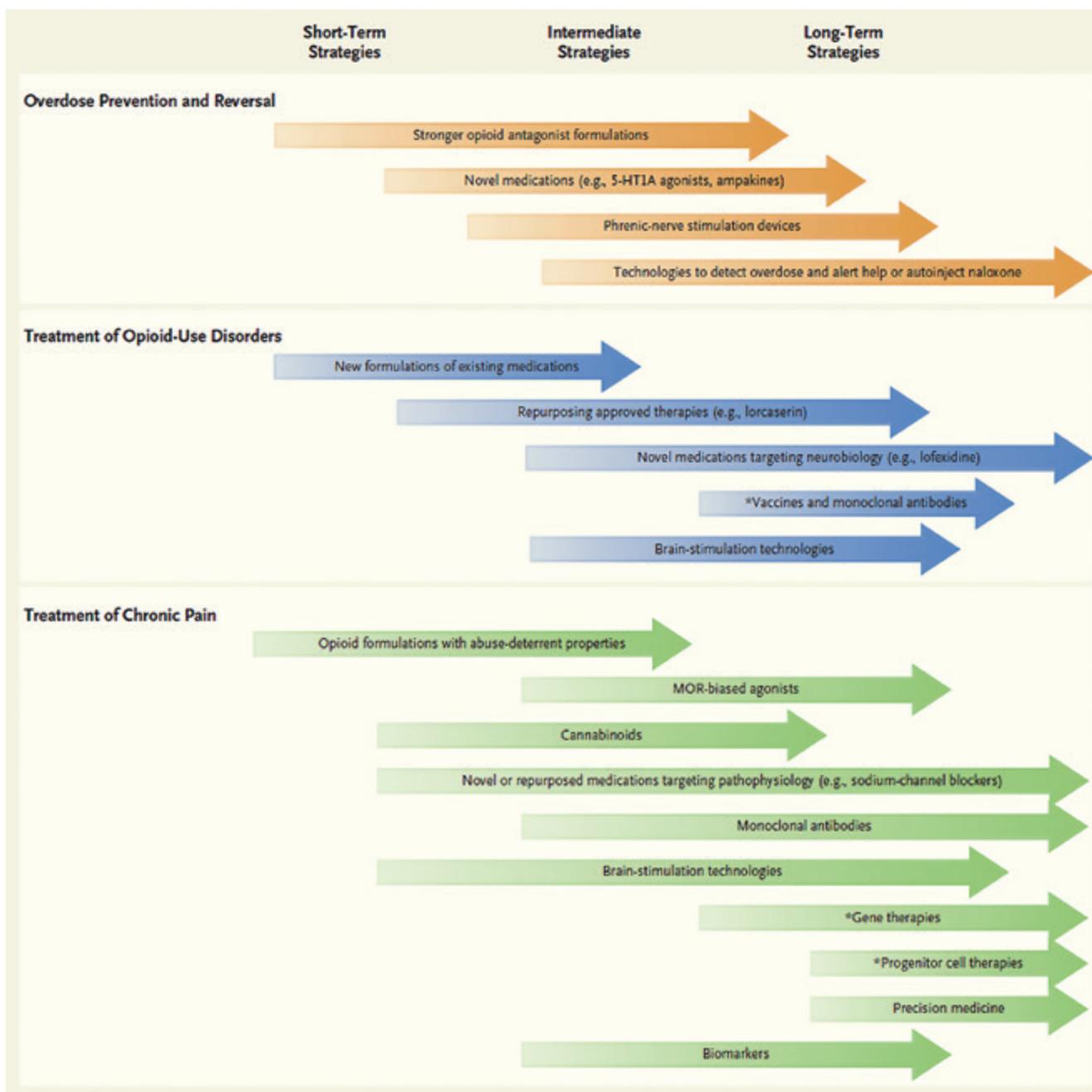


Рисунок 1. Направления исследований по проблеме противодействия опиоидному кризису [15]

- совершенствование средств предотвращения передозировок и антидотной терапии;
- разработку методов лечения заболеваний, связанных с употреблением опиоидов, и реабилитации наркозависимых;
- модернизацию средств лечения хронической боли.

Фармакологическая составляющая направлений купирования опиоидного кризиса включает:

- введение в клиническую практику новых, более безопасных соединений-анальгетиков (включая их пролекарства);
- ведение в клиническую практику новых антагонистов опиоидных рецепторов как в качестве более мощных антидотов, так и в качестве более эффективных средств предотвращения и купирования последствий использования опиоидов;
- введение в клиническую практику новых, более безопасных препаратов на основе опиоидных комбинаций фиксированного состава, как уже известных (опиоид + неопиоид, опиоид + антагонист), так и с использованием новых фармацевтических решений;
- введение в клиническую практику новых средств терапии зависимостей;
- создание мощных неопиоидных анальгетиков;
- использование высокомолекулярных соединений, включая пептиды;
- введение в клиническую практику новых биомаркеров для прогнозирования возможной аддикции или передозировки при лечении опиоидами (оценка индивидуальной чувствительности).

Отмечено, что препараты на основе сочетания сильнодействующих анальгетиков, обладающих высоким терапевтическим индексом, с прогрессивными лекформами (например, неинъекционные лекформы на основе суфентанила) являются перспективными продуктами, которые по мере их разработки запускают инновационные процессы в фармацевтике сильнодействующих лекарств в целом, в том числе средств

неотложной терапии [2]. Разработка быстродействующих средств неотложной терапии (анальгетики, анестетики, антидоты, стимуляторы, противорвотные и др.) является одним из драйверов разработки ЦНС-специфичных препаратов в целом.

Одним из практических результатов HEAL Initiative может быть введение в клиническую практику более эффективных и безопасных анальгетиков и исключение из перечня допустимых для использования в развитых странах субстанций некоторых опиоидов с интенсивно выраженными побочными эффектами и низким терапевтическим индексом, например фентанила и морфина. Также вероятно значительное снижение использования простых инъекционных и пероральных форм, как препаратов с наиболее выраженными побочными эффектами, то есть не соответствующих возрастающим требованиям безопасности. Фармкомпании, производящие морально устаревшие сильнодействующие субстанции и/или морально устаревшие готовые формы, будут обозначаться как производители социально опасных продуктов и активно вытесняться конкурентами с глобального рынка.

РАЗРАБОТКА ОПИОИДОВ С ПОНИЖЕННЫМИ ПОБОЧНЫМИ ЭФФЕКТАМИ

Для разработки безопасных опиоидов [16] используются различные подходы, в том числе и на основе активации μ -опиоидного рецептора с помощью G-белка, что может повысить эффективность при приемлемой переносимости по сравнению с обычными опиоидами [17]. На основе данного подхода был разработан опиоид олисеридин [(+)-TRV130] для лечения острой боли от умеренной до тяжелой степени (рисунок 2), а также ряд других соединений, например PZM-21 (рисунок 2).

Олисеридин демонстрирует эквианальгетическое действие в дозах в 1,5–2 раза ниже морфина (MED~2) и обладает существенно менее выраженными побочными эффектами (тошнота, рвота, угнетение дыхания). Механизм действия предполагает (рисунок 3) активацию μ -опиоидного рецептора с участием

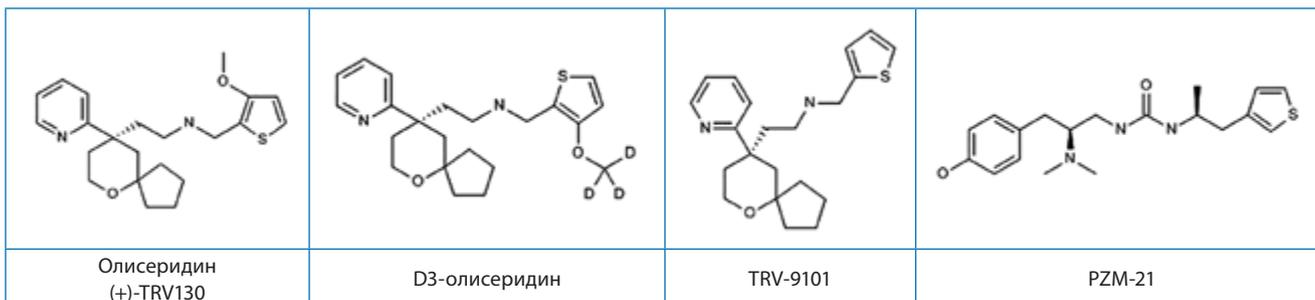


Рисунок 2. Анальгетики – агонисты μ -опиоидного рецептора с эффектом ингибирования β -аррестина [1]

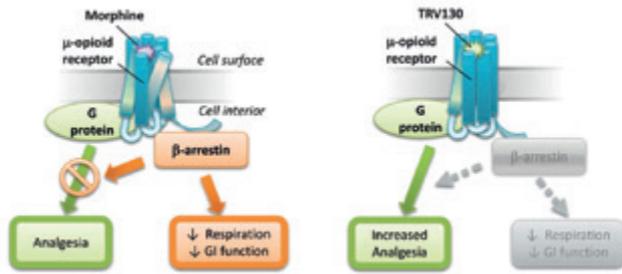


Рисунок 3. Специфический агонист ми-опиоидного рецептора олисеридин (TRV130) предпочтительно активирует сигнальные пути G-белка по сравнению с β -аррестином, за счет чего усиливает анальгезию и снижает побочные эффекты относительно морфина [18]

G-белка, что повышает эффективность анальгезии при лучшей переносимости по сравнению с обычными опиоидами [18–22].

Клинические исследования продемонстрировали анальгетическую эффективность TRV130 у пациентов с тяжелой острой болью в модели бурсэктомии. Сравнительное однократное внутривенное введение 1, 2, 3 мг олисерицина пациентам (относительно введения 4 мг морфина) показало его значительно (до 4 раз) более высокую анальгетическую эффективность (рисунок 4).

Клинические исследования многократного введения также продемонстрировали анальгетическую эффективность TRV130 у пациентов с тяжелой острой болью в модели бурсэктомии. Сравнительное внутри-

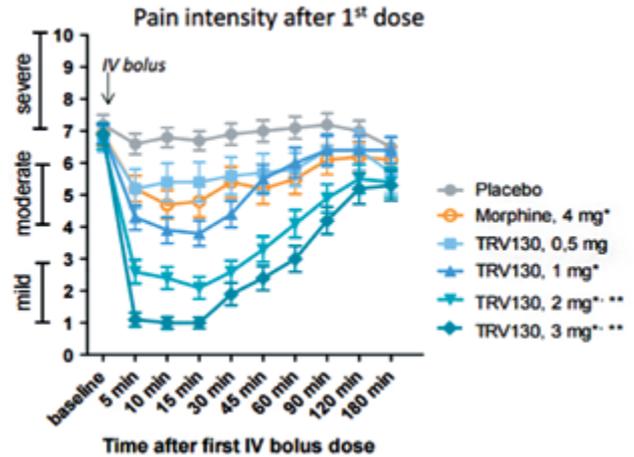


Рисунок 4. Сравнение интенсивности боли у пациентов после бурсэктомии при однократном внутривенном введении олисерицина и морфина [18]

венное введение 0,5, 1, 2, и 3 мг олисерицина (относительно введения 4 мг морфина каждые 4 часа) показало его большую эффективность и быстрое действие (рисунок 5).

Показано, что комбинированное подкожное введение TRV130 (0,5 и 1 мг/кг) и фентанила (60 мкг/кг) мышам приводит к подавлению развития толерантности к опиоидам. Авторы полагают, что комбинирование с олисерицином практически применимо для уменьшения развития толерантности к анальгетикам на основе различных опиоидов [23].

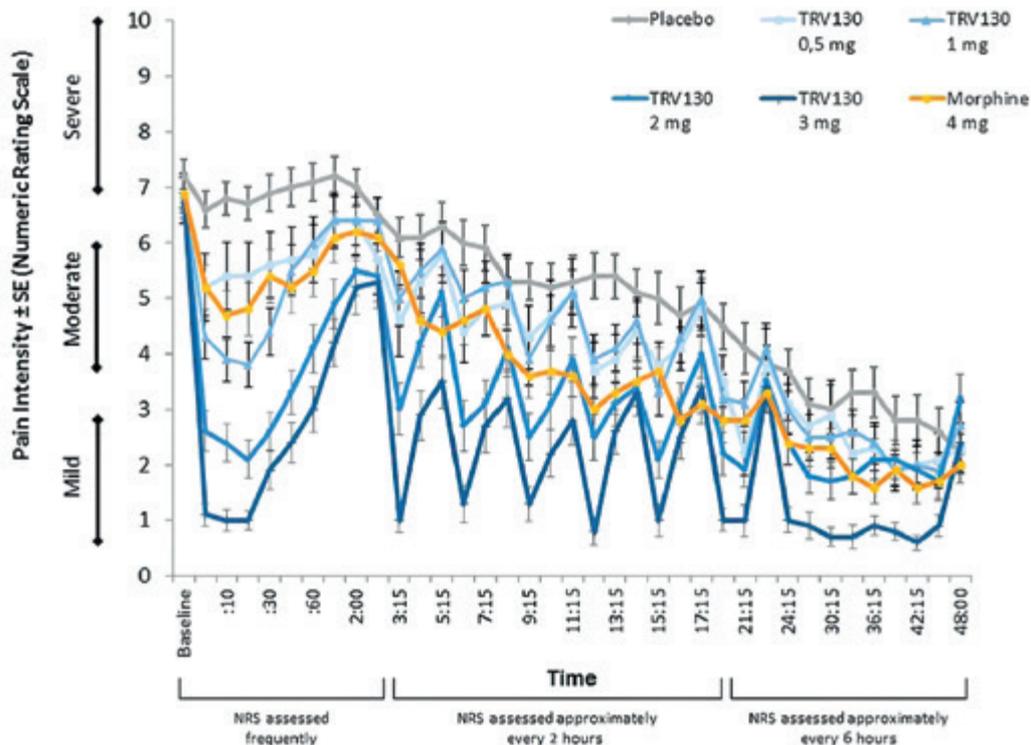


Рисунок 5. Сравнение интенсивности боли в течение 48 часов у пациентов после бурсэктомии при многократном внутривенном введении различных доз олисерицина, морфина и плацебо [18]

В 2015 году описеридин одобрен в США для лечения средней и тяжелой острой боли, вызванной медицинскими манипуляциями или хирургическим вмешательством в 2016 году одобрен FDA для терапии прорывной боли. В 2018 году лекарство лицензировано для разработки и коммерциализации в Южной Корее и Китае [1]. В рамках стратегии купирования опиоидного кризиса описеридин рассматривается в качестве одного из вариантов замены морфина при инъекционной анальгезии.

ТЕКУЩАЯ СИТУАЦИЯ В РОССИИ

Ситуация с потреблением наркотиков в РФ обусловлена сочетанием высокого незаконного потребления опасных опиоидов с крайним дефицитом наркотических анальгетиков и примитивным ассортиментом отечественных лекформ. По оценкам ООН, Россия в течение ряда лет занимает первое или второе место в мире (наряду с ЕС с населением более 500 млн чел.) по объему потребления героина – от 75 до 80 тонн в год [6]. Относительная смертность в РФ вследствие передозировки наркотиков (на 100 тыс. населения) выше, чем в США. По оценке главы ФСКН, в России в 2015 г. насчитывалось 7,3 млн потребителей наркотиков [24]. Отсутствие системы метрологического обеспечения в области контролируемых психоактивных веществ (фактически отсутствует даже регламентированный количественный анализ) противоречит законодательству РФ в области обеспечения единства измерений [2, 9]. Сравнение потребления героина в РФ и отечественного производства анальгетиков на основе опиоидов для медицинского потребления – 300 кг в единицах MED [9] – показывает ($80000 \times 4,5 / 300 = 1200$, где 4,5 – среднее значение MED героина [25]), что криминальное потребление только героина в РФ более чем на три порядка выше суммарного медицинского использования опиоидов.

Существенную часть текущего ассортимента анальгетиков для купирования сильной и средней боли в РФ традиционно составляют синтетические (промедол, просидол, фентанил, трамадол, тапентадол и др.) и полусинтетические (например, бупренорфин) опиоиды [26]. Однако значительная часть данных лекарств морально устаревают и теряет конкурентоспособность на фоне внедрения в зарубежную клиническую практику более эффективных синтетических опиоидов и комбинаций на их основе. В настоящее время в развитых странах в качестве АФС используются около 50 наркотических анальгетиков и их комбинаций, из них примерно 30 (60%) – на основе синтетических опиоидов и 20 (40%) – на основе природных опиатов и полусинтетических опиоидов [1]. В различных клинических стадиях в развитых странах находится около 85 АФС наркотических анальгетиков и их комбинаций, из них примерно 65 (76%) – на основе синтетических опиоидов и 20 (24%) – на основе природных опиатов и полусинтетических опиоидов [1].

Очевидная потребность увеличения объема производства анальгетиков в РФ более чем в 10 раз (в морфиновом эквиваленте) и разработки современных лекформ означает необходимость создания данного сегмента НИОКР и фармпроизводства фактически заново [9]. Разработка в РФ новых препаратов сильных анальгетиков целесообразна на основе именно синтетических веществ с высоким инновационным потенциалом.

В качестве решения проблемы предлагается культивирование, выделение и переработка природных опиатов в объеме, покрывающем 80% потребности РФ в сильных анальгетиках [27]. Это решение является спорным с точки зрения современной фармакологии, поскольку природные опиаты (наркотические алкалоиды опиума, из которых наиболее востребован морфин) обладают неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами, низким ТИ и недостаточно быстро и эффективно преодолевают ГЭБ. Поэтому их использование требует значительно более высоких терапевтических доз (относительно их высокой аффинности к опиатным рецепторам ЦНС), что приводит к выраженным побочным эффектам, включая угрожающие жизни и здоровью пациента [2]. Акцент на преимущественное использование природных опиатов нерационален с точки зрения развития промышленного производства в РФ, технологически и исторически ориентированного на синтетические и полусинтетические опиоиды, а также создает зависимость от цикла производства природного сырья и его импорта. Культивирование наркосодержащих растений несет угрозу неконтролируемого распространения семенного генно-модифицированного материала с повышенным содержанием опиатов, неприхотливого к условиям произрастания, результатом чего стал 43% рост криминального производства опиата в Афганистане в 2016 г. относительно его производства в 2015 г. за счет круглогодичного выращивания [28].

Возможность системных исследований и разработок новых лекарственных препаратов на основе контролируемых психоактивных веществ ограничена ввиду отсутствия в РФ специализированного R&D-центра и структуры управления НИОКР. Фактически большинство фармацевтических НИОКР в РФ носят субъективный несистемный характер, объясняемый «рыночными» интересами отдельных предприятий, оцениваемыми на основе анализа текущих объемов продаж. Единого центра анализа передового опыта, координации работ, экспертизы результатов НИОКР и отбора лучших разработок (по аналогии с работой NIH, FDA и CDC в США) в РФ нет.

Оценка перспективности воспроизведения известных АФС и ГЛФ сильных анальгетиков на основе анализа их текущих продаж нерациональна на фоне смены парадигмы, происходящей в процессе противодействия развитию опиоидного кризиса и резко ускоряющей моральное старение традиционных сильно-

действующих лекарств. Процесс воспроизведения и регистрации морально устаревающих традиционных зарубежных АФС и ГЛФ займет несколько лет, а к этому времени на глобальном рынке появятся новые, улучшенные препараты, в настоящее время проходящие 2–3-ю стадии клинических исследований в развитых странах [1, 14]. В рамках мероприятий по сдерживанию опиоидного кризиса вводятся новые стандарты безопасности медицинского использования наркотических средств, препятствующие использованию морально устаревших препаратов и корректирующие глобальный рынок в интересах инновационных фармкомпаний [13–15].

В качестве среднесрочных решений для разработки улучшенных анальгетиков от сильной боли в РФ актуальны следующие направления:

- внедрение более безопасных известных и инновационных АФС синтетических опиоидов и разработка линейки ГЛФ на их основе;
- разработка пролекарств, как улучшенных форм АФС;
- внедрение в практику АФС в форме мультитаргетных комбинаций, включая как простые комбинации фиксированного состава, так и вновь разработанные солекарства [5];
- разработка более безопасных (нет начального скачка концентрации, защита от немедицинского использования) и удобных для использования лекформ, как быстродействующих (буккальные и назальные), так и пролонгированных (пластыри и депо-формы).

В качестве долгосрочного решения актуально создание и введение в клиническую практику сильнодействующих неопиоидных анальгетиков [29, 60].

Необходимость организации отечественного фармпроизводства сильнодействующих анальгетиков и анестетиков практически заново позволит создать производство анальгетиков РФ именно на основе наиболее современных субстанций и типов готовых форм, а не воспроизведения морально устаревающих (на фоне технологического отставания передовых мировых разработчиков на вызовы опиоидного кризиса) зарубежных препаратов. Данный подход не только даст стимул научно-технологическому развитию, но и увеличивает экспортный потенциал фармпроизводителей РФ.

БАЗОВЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ АНАЛЬГЕТИКОВ

Природные опиаты демонстрируют неудовлетворительные фармакокинетические и фармакодинамические (PK/PD) свойства (значительно уступая лучшим синтетическим анальгетикам, например фентанилам),

имеют низкую проницаемость через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), низкий ТИ, низкие значения морфинного эквивалента [2], следствием чего являются высокие терапевтические дозы и выраженные побочные эффекты.

Оценка терапевтического индекса для человека с учетом индивидуальных особенностей – это значительно более сложный процесс по сравнению с экспериментами на животных. На рисунке 6 схематично показано изменение величины ТИ опиоидов в зависимости от возраста и физического статуса пациентов.

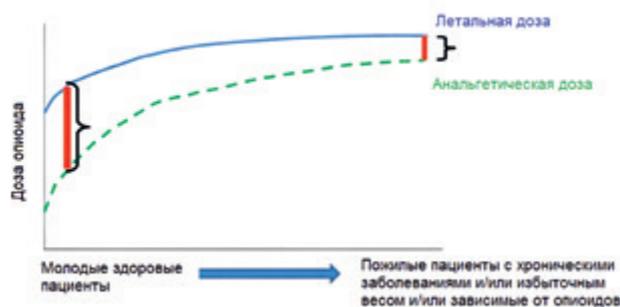


Рисунок 6. Схематическая иллюстрация зависимости летальной и анальгетической дозы от возраста и физического состояния пациента (адаптировано) [30]

Высокое значение ТИ крайне важно для безопасности анальгезии с учетом индивидуальных особенностей пациентов. Использование опиоидов с низким ТИ требует дополнительных затрат на контроль состояния пациента и наличия антидота, поэтому совокупная стоимость использования опиоидов с низким ТИ существенно выше. Только опиоиды с высоким ТИ могут быть использованы для пациент-контролируемой анальгезии, поэтому данные вещества наиболее перспективны для разработки новых препаратов как с медицинской, так и с экономической точек зрения.

Наиболее распространенный природный анальгетик морфин из-за низкой проницаемости ГЭБ используется в несоразмерно высоких (относительно его аффинности) терапевтических дозах [2]. Это помимо характерных побочных эффектов опиатов, дополнительно вызывает подавление иммунитета [31–33] и одновременно активирует рост сосудистой ткани в области опухолей и пролиферацию злокачественных опухолевых клеток [34, 35]. Использование морфина целесообразно в стационарных клинических условиях для анальгезии травматической и сердечно-сосудистой боли у пациентов без онкологической и возрастной патологии. В большинстве других случаев использование морфина наносит вред пациенту.

Следствием слабой проницаемости природных опиатов, подавляющего большинства их пролекарств и полусинтетических производных через биологические барьеры (кожные покровы и ГЭБ) является необ-

ходимость использования относительно высоких доз, даже при инъекционном введении. Эффективное использование данных анальгетиков возможно в основном в составе инъекционных и пероральных лекформ. Данные лекформы имеют характерный набор ограничений и недостатков при медицинском использовании. Поэтому простые природные опиаты и их производные на текущем этапе развития фармацевтики исчерпали потенциал в качестве основных компонентов инновационных препаратов анальгетиков.

Вклад стоимости простых инъекционных и пероральных препаратов на основе природных опиоидов в совокупную стоимость анальгезии с их использованием составляет от нескольких процентов при инфузионном введении до ~25% при менее затратных способах введения [36, 37]. Факт наличия инъекционных препаратов не решает проблему анальгезии в целом и требует дополнительных, более значительных расходов на материалы, препараты и квалифицированный медперсонал. Соответственно, совокупная стоимость анальгезии простыми опиатами превышает стоимость самого фармпрепарата в 4–100 раз. Эта совокупная стоимость существенно превышает стоимость новых, более эффективных и удобных (то есть не требующих существенных дополнительных расходов при введении) неинъекционных препаратов на основе мощных синтетических анальгетиков и делает их производство экономически целесообразным.

Использование наиболее эффективных и сильнодействующих синтетических опиоидов (вместо традиционных, более слабых природных и полусинтетических) позволяет расширить разнообразие лекарственных форм и практически реализовать концепцию анальгетиков с заданными фармакологическими и функциональными свойствами [2]. Это подразумевает варьирование видов введения, а также таких параметров, как быстрое действие, безопасность многократного увеличения дозы (в зависимости от терапевтического индекса) и продолжительность действия препарата, что принципиально повышает безопасность пациентов в полевых условиях. Содержание наиболее мощных синтетических опиоидов составляет менее 1% от веса стандартной лекарственной формы, что позволяет включать в ее состав различные вспомогательные химические компоненты, расширяющие функциональные свойства и/или увеличивающие безопасность и удобство использования препарата. Это позволяет создавать комплексные препараты «все-в-одном» с увеличенным анальгетическим эффектом и/или купированием побочных эффектов опиоидов, а также с защитой от немедицинского использования. Создание улучшенных лекформ резко снижает трудозатраты медперсонала и расходы на дополнительные материалы (шприцы, инфузионные растворы и др.) и вспомогательные фармпрепараты, делает возможным внедрение методологии пациент-контролируемой анальгезии.

Среди сильнодействующих синтетических опиоидов наибольший интерес представляют соединения с оптимальными транспортными свойствами, обеспечивающими быстрое и эффективное преодоление ГЭБ. Это упрощает разработку эффективных готовых форм и позволяет использовать трансмукозный или трансдермальный способ введения. Сочетание высокой аффинности с оптимизацией транспортных свойств делает возможным использование вещества в составе максимально возможного спектра лекформ. Это позволяет обеспечить индивидуальный подход при анальгезии и унификацию процессов за счет использования всего одного опиоида как в различных технологических процессах, так и для решения различных медицинских задач, используя разнообразие лекарственных форм. Принципиальным является высокое значение терапевтического индекса, исключающее риск случайной передозировки, особенно в полевых условиях чрезвычайных ситуаций и вооруженных конфликтов. Также существенно снижается риск летального исхода при немедицинском применении. Использование одной активной синтетической субстанции для различных лекарственных форм снижает ее себестоимость, то есть имеет место производство АФС с увеличивающейся отдачей по мере расширения разнообразия лекформ. При этом производство не зависит от природных, политических и многих других факторов.

Таким образом, использование простых природных опиатов в составе анальгетиков носит исторический характер и имеет тенденцию к снижению относительно синтетических опиоидов [38]. Применение препаратов на основе морфина считается обоснованным главным образом в случае травм и сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов без онкологической и выраженной возрастной патологии. Считается, что препараты на основе морфина не отвечают современным требованиям неотложной полевой анальгезии [39]. Преимущества синтетических анальгетиков над природными и полусинтетическими позволяют улучшить качество, разнообразие, индивидуальность и безопасность анальгезии. Доступность исходных органических реагентов делает процесс получения субстанций независимым от технологической и политической конъюнктуры. Переход на эффективные опиоиды в составе более сложных лекформ (относительно простых инъекционных и пероральных) приводит не только к снижению совокупной стоимости опиоидной анальгезии сильной и средней боли, но и к увеличению конкурентоспособности и экспортного потенциала продукции. При этом внедрение в практику методологии противодействия опиоидной эпидемии требует минимизации использования, а в идеале – исключения из практики анальгезии соединений с низким ТИ, например фентанила и морфина.

ОСНОВНЫЕ КРИТЕРИИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЫБОР СОЕДИНЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ АНАЛЬГЕТИКОВ

С точки зрения возможности создания препаратов анальгетиков с заданными свойствами и расширения разнообразия функциональных лекарственных форм наибольший интерес представляют опиоиды, сочетающие:

- высокую анальгетическую активность (выражаемую в единицах MED);
- высокий терапевтический индекс (ТИ);
- наименьшее время достижения максимальной концентрации в крови (T_{max} при внутривенном введении);
- минимальное значение полупериода установления равновесия кровь/ткань ЦНС – $t_{1/2k_{e0}}$;
- положительную величину коэффициента $LogBV$, численно характеризующую соотношение равновесного распределения вещества в тканях мозга и крови [40];

- значения коэффициента распределения $\log D_{7,4}$ ($pH=7,4$ – физиологическое значение среды крови человека) в интервале $1 < \log D_{7,4} < 3$ [2, 41].

Данный первичный набор параметров характеризует мощность, быстрое действие, тканеспецифичность и безопасность наркотических анальгетиков, но не учитывает индивидуальную чувствительность и биохимические особенности их метаболизма и продолжительность анальгетического действия, которую можно варьировать и за счет использования соответствующих лекарственных форм.

На рисунке 7 представлены структуры наиболее востребованных наркотических анальгетиков для терапии сильной и средней боли, входящие в состав используемых, а некоторые – и перспективных лекарственных форм.

Вещества представляют собой мощные агонисты опиатных рецепторов (за исключением слабых агонистов промедола и просидола), главным образом μ -типа. В отличие от остальных метадон (не используется в РФ) обладает мультитаргетной анальгетической активностью, также являясь антагонистом NMDA-рецепторов. Изомер D-(-)-метадон (L-поламидон, левометадон) является выраженным агонистом μ -опиатного рецептора и используется в качестве анальгетика. (S)-метадон (декстрометадон) – выражен-

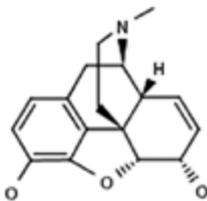
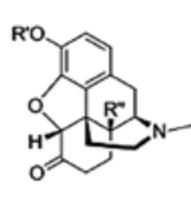
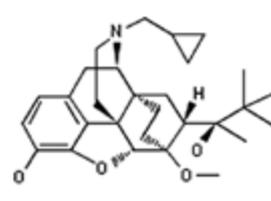
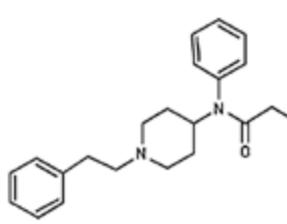
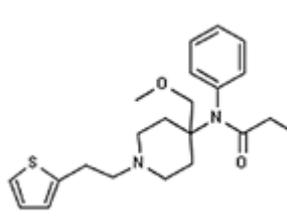
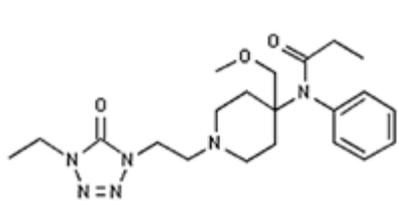
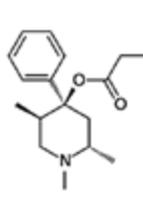
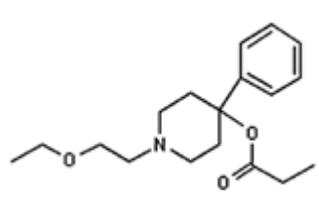
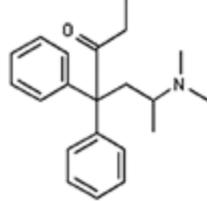
		
Морфин	Гидрокодон $R' = CH_3$, $R'' = H$ Оксикодон $R' = CH_3$, $R'' = OH$ Гидроморфон $R' = H$, $R'' = H$ Оксиморфон $R' = H$, $R'' = OH$	Бупренорфин
		
Фентанил	Суфентанил	Алфентанил
		
Промедол	Просидол	Метадон

Рисунок 7. Структуры некоторых актуальных опиоидных анальгетиков

ный антагонист NMDA-рецепторов (примерно в 10 раз слабее) – исследуется в качестве средства купирования нейропатической боли и депрессии [42].

В таблице 1 представлены данные по аффинности (K_i) к μ -опиатному рецептору *in vitro*, MED, терапевтическому индексу, полупериоду установления равновесия плазма/ЦНС ($t_{1/2k_{e0}}$), коэффициенту распределения $\log D_{7,4}$, времени достижения максимальной концентрации T_{max} при внутривенном введении и острой токсичности (LD_{50}) опиоидов и неопиоидов, актуальных для анальгезии сильной и средней боли.

Из данных таблицы 1 видно, что морфин сильно уступает приведенным фентанилам по интенсивности обезболивания, выраженной в единицах MED. При этом аффинность морфина к μ -опиатному рецептору (MOR), характеризуемая величиной K_i , практически идентична аффинности значительно более сильного анальгетика фентанила. Аффинность морфина к другим опиатным рецепторам характеризуется соотношением величин констант $K_i(\mu)/K_i(\delta)/K_i(\kappa)=1/57/19$ [44], поэтому анальгетическими эффектами связывания с δ - и κ -рецепторами можно пренебречь. Значительно более аффинный гидроморфон уступает фентанилу в мощности обезбо-

ливания примерно в 10 раз, а бупренорфин – в 2 раза. Данные различия параметров активности в тестах *in vitro* и *in vivo* объясняются неоптимальными транспортными свойствами морфина и гидроморфона. С другой стороны, промедол, на два порядка менее аффинный к μ -рецептору относительно морфина, но обладающий оптимальными фармакокинетическими свойствами, демонстрирует обезболивание на уровне морфина.

По скорости распределения из кровотока в ткани ЦНС (которая характеризуется экспериментальной величиной – полупериодом установления равновесных концентраций $t_{1/2k_{e0}}$) морфин уступает всем остальным анальгетикам таблицы 1. Также морфин имеет высокое время образования максимальной концентрации в крови (T_{max}) после внутривенного введения. Это демонстрирует один из ключевых недостатков морфина (и его близких полусинтетических аналогов) – неоптимальную фармакокинетику, включая низкую способностью преодолеть ГЭБ [54], что при клиническом использовании ведет к резкому увеличению дозы, например в 80–100 раз относительно фентанила – опиоида с близкой аффинностью *in vitro* [55]. Также наблюдается 3–10-кратное снижение быстродействия морфина в эквивалентной дозе относительно

Таблица 1.

Свойства некоторых опиоидных и неопиоидных анальгетиков центрального действия, а также антидота налоксона, актуальных для неотложной полевой анальгезии [2, 43–53, 57–59]

Анальгетик	$K_i(\mu)$ (эсп.) нМ* [47, 48]	MED	ТИ [49]	T_{max} (мин, чел./ крысы в/в)	$t_{1/2k_{e0}}$ (эсп.) мин [58]	$\log D_{7,4}$ (расчет) [50]	$\log P$ (эсп.) [51, 52]	$\log BB^{**}$ (расчет)	LD_{50} мг/кг [52, 53, 59]
Морфин	1,17	1	71	5/30	168	-0,8	0,89	-0,03	156 мыши в/в
Гидроморфон	0,37	4	232	10/	46	0,5	0,9	0,17	104 мыши в/в
Метадон	3,38	3–4			9	3,4	3,93	0,83	11 крысы в/в
Бупренорфин [57]	0,22	25–40		2,4/	47,4/75	4,4	4,98	0,71	146,5 крысы в/в
Промедол	~150	0,5–1	~40	5	~10	1,2	~3	0,56	40 крысы п/к
Алфентанил	7,39	10–25	1080	/1	1,4	2,15	2,16	-0,08	47 крысы в/в
Фентанил	1,35	50–100	277	4,6/4	6,6	2,1	4,05	0,55	3,1 крысы в/в
Суфентанил	0,14	500–1000	26716	3/8	6,2	2,0	3,55	0,41	18,7 мыши в/в
Карфентанил [43, 44]	0,024	10000–100000	8460	/10		2,9	3,7	0,42	3,1 крысы в/в
Олисередин	27	1,5–2		Менее 5		2,45	3,93	0,42	
Налоксон	1,52	–		4/	5–6,5	1,0	2,09	0,21	107 крысы в/в
Кеторолак [45]	–	0,3			24	-0,7	2,1	-1,32	189 крысы п/о
Кетамин [46] (S-Кетамин)	–	0,3 (0,5)			~1	3,1	2,9	0,34	42,9 мыши в/в

Примечание: * Human MOR, замещение [3Н]-DAMGO.

** Расчет выполнен с использованием ACD/Percepta 14.0.0 (Build 2076).

анальгетически актуальных фентанилов (таблица 1) при инъекционном введении [56].

Близкая к морфину эквианальгетическая активность и умеренные побочные эффекты отечественных промедола и просидола (обладающих на два порядка более низкой аффинностью к опиоидным рецепторам) объясняются их оптимальными фармакокинетическими свойствами, включая высокую способность преодолевать ГЭБ.

ВЫБОР АФС И ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЗА СЧЕТ МОДИФИКАЦИИ РК/PD-СВОЙСТВ СОЕДИНЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Алгоритм выбора предпочтительных веществ и лекарственных форм для неотложной фармакотерапии (когда быстрое действие препарата – один из основных лимитирующих параметров выживания пациента) с учетом величины дозы, требований удобства и безопасности введения представлен на рисунке 8. Данный алгоритм имеет универсальный характер и может быть использован для разработки различных групп лекарственных средств, действующих на биомишени ЦНС, например анальгетиков, анестетиков, противорвотных средств, психостимуляторов, антидотов и др. Это позволяет проводить разработку групп препаратов на основе универсальной фармацевтической технологической платформы для ЦНС-специфичных лекарств, включая как быстродействующие, так и пролонгированные.

Синим цветом выделен алгоритм выбора компонентов АФС из числа известных лекарственных соединений. Красным цветом выделена область модификации (транспортных свойств) известных активных соединений с целью создания новых соединений и форм (со- и пролекарств, нековалентных конъюгатов) с заданными свойствами.

Область комбинаций фиксированного состава сильных анальгетиков изучена относительно хорошо, имеется ряд препаратов. На клинических и доклинических стадиях исследовано около 90 комбинаций фиксированного состава анальгетиков и анестетиков, распределение препаратов по стадиям представлено на рисунке 9А.

Значительно менее изучена область нековалентных конъюгатов и пролекарств (рисунок 9Б). Область солекарств является новым направлением медицинской химии и фармацевтики, поскольку для получения солекарств к комплексу требований, предъявляемых к лекарству, добавляется еще одно – наличие в молекуле лекарства структурного фрагмента, способного к образованию ковалентной связи. Кроме того, для кандидата в солекарство необходимо подобрать вещества-партнеры с близким уровнем активности *in*

vivo. В случае лекарств, действующих в низких дозах, задача поиска партнера для солекарства значительно усложняется, однако именно разработка солекарств является одним из технологических направлений для прорыва в области разработки сильнодействующих и безопасных анальгетиков.

ЦЕНТРАЛИЗАЦИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК В ОБЛАСТИ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

В ответ на вызовы опиоидного кризиса программа США по совершенствованию медицинского обеспечения пациентов с выраженным болевым синдромом и обеспечения общественной безопасности запускает процесс принципиального изменения структуры сильных анальгетиков, средств и подходов к купированию пробочных эффектов опиоидов, а также средств и методов антидотной терапии. Руководство программой осуществляется при координации работ крупнейших государственных организаций – NIH, FDA, CDC, включая военно-медицинские [61, 62]. Наблюдаемый тренд ведет к изменению приоритетов в терапии, меняет задачи R&D и активизирует поиск новых решений, что ведет к значительному изменению глобального рынка средств обезболивания. При этом возможно исключение из перечня допустимых для использования в развитых странах некоторых инъекционных и пероральных форм опиоидов, как средств, не соответствующих критериям «риск – польза». На фоне продвижения разработок в перспективе вероятно исключение из числа разрешенных ряда АФС на основе опиоидов с низким терапевтическим индексом (таблица 1) и выраженными побочными эффектами, например фентанила и морфина. При этом фармкомпании, продолжающие использовать данные вещества, могут обозначаться как производители опасных продуктов и вытесняться с глобального рынка регуляторными методами. Тенденция внедрения в клиническую и ветеринарную практику опиоидов с MED более 50–100, а также появление наиболее мощных фентанилов, например карфентанила [63] (таблица 1), в качестве криминальных наркотиков требует введения в клиническую практику более эффективных антидотов, чем налоксон [64].

Наблюдаемые тренды вносят существенные изменения в промышленное производство, обеспечение пациентов, обеспечение общественной безопасности, а также влияют на возможности экспортного потенциала, поэтому в РФ целесообразно создание структуры, проводящей научно-техническую и социальную политику на уровне лучших мировых практик. В процессе развития данной структуры целесообразно объединить комплекс задач в области не только наркотических веществ и препаратов на их основе, но и всех фармацевтических и ветеринарных средств на основе сильнодействующих соединений. R&D-структура, сочетающая задачи медицинского обеспечения населе-

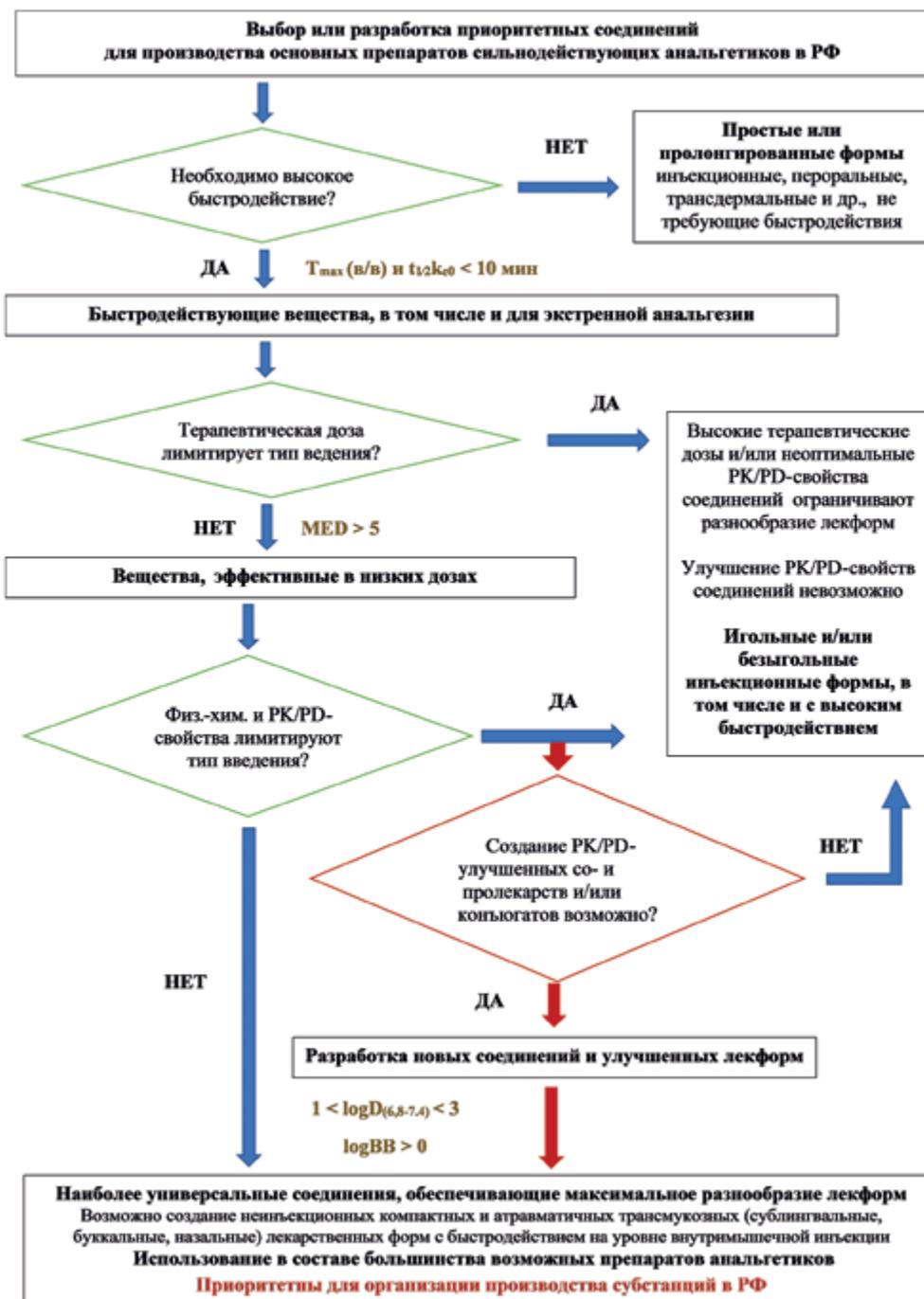


Рисунок 8. Алгоритм выбора соединений и лекарственных форм с заданными функциональными свойствами. Синим выделен алгоритм разработки препаратов на основе известных соединений, красным выделено направление создания новых соединений и форм (со- и пролекарств, нековалентных конъюгатов) с заданными свойствами

ния и личного состава силовых структур инновационными препаратами, может быть создана, например, в одном из ведомств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительное финансирование задачи преодоления опиоидного кризиса в США запускает глобальный процесс смены парадигмы в фармацевтике сильнодействующих анальгетиков в развитых странах. Это

ведет к изменению структуры используемых соединений, лекарственных форм, медицинских изделий и методов терапии. В области наркотических анальгетиков с умеренной активностью наблюдается попытка замены морфина на синтетические опиоиды с пониженными побочными эффектами, например агонисты μ -опиоидного рецептора с эффектом ингибирования β -аррестина. В области более мощных анальгетиков наблюдается вытеснение фентанила аналогами, обладающими высоким терапевтическим индексом и

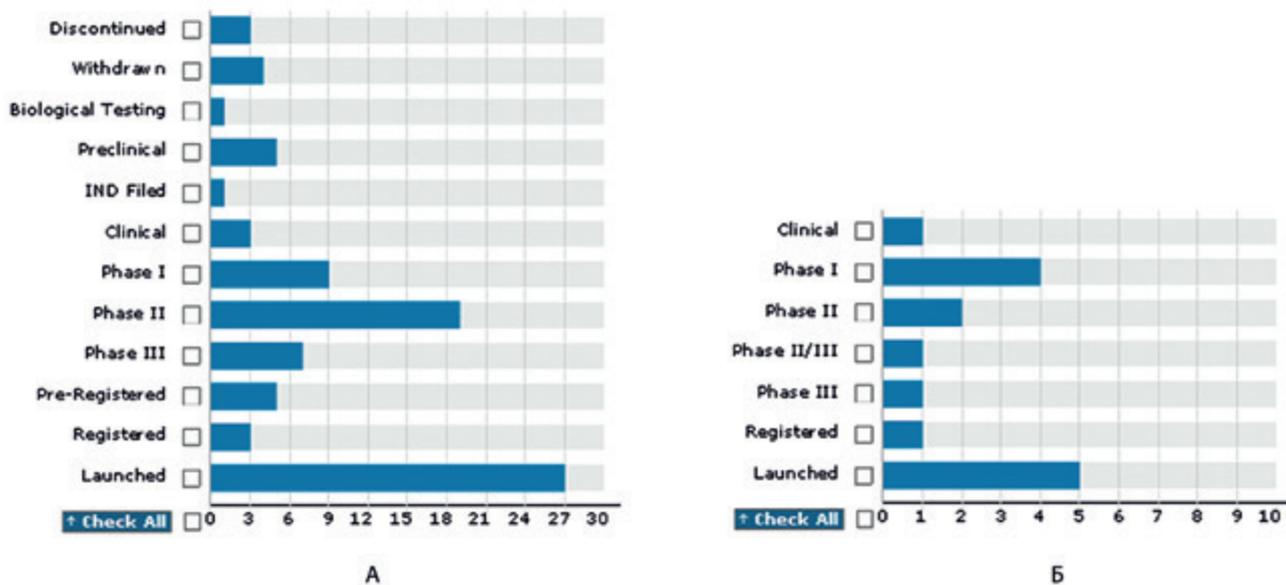


Рисунок 9. Распределение комбинаций фиксированного состава (А) и пролекарств (Б) анальгетиков и анестетиков по стадиям исследований [1].

А. Распределение комбинаций фиксированного состава анальгетиков и анестетиков по стадиям исследований

Б. Распределение пролекарств анальгетиков и анестетиков по стадиям исследований

высокой ЦНС-проникающей способностью. Проходят клинические исследования комбинированные препараты с пониженным риском развития зависимости и толерантности, а также защитой от немедицинского использования. Проводятся исследования неинъекционных ГЛФ, исключающих пиковый скачок начальной концентрации лекарства. Отрабатываются новые препараты и технологии лечения наркозависимых и антидотной терапии. В США работы проводятся при координации и контроле со стороны крупнейших государственных организаций как гражданского сектора, так и сектора общественной безопасности, включая правоохранительные и оборонные структуры.

Ситуация в РФ характеризуется отсутствием как производства и разработки современных субстанций и препаратов сильных анальгетиков, так и понимания путей развития. Акцент на преимущественный выпуск препаратов на основе природных опиатов является попыткой копирования морально устаревших зарубежных решений.

Необходимым начальным этапом является создание экспертной структуры для анализа передового опыта и выработки стратегии в области сильнодействующих лекарственных и ветеринарных средств, включая анальгетики, анестетики, антидоты и другие жизненно важные средства терапии. Структура для координации, контроля разработок и производства новых сильнодействующих лекарств в РФ должна сочетать задачи медицинского обеспечения населения и личного состава силовых структур эффективными и безопасными препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. База данных Integrity. [База данных Integrity. [The Integrity database]. Available at: https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_home.util_home (accessed 14.05.2018).
2. Соснов А. В., Семченко Ф. М., Власов М. И., Тохмахчи В. Н., Соснова А. А., Кинзирский А. С. Разработка неинъекционных препаратов центрального действия для неотложной терапии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 92–111. [Sosnov A. V., Semchenko F. M., Vlasov M. I., Tohmahchi V. N., Sosnova A. A., Kinzirsy A. S. Razrabotka nein'ektsionnykh preparatov tsentral'nogo deistviya dlya neotlozhnoi terapii // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Development of non-injectable medicinal drugs acting on CNS for emergency therapy // Drug Development & Registration]. 2018. № 1(22). P. 92–111].
3. Joint Meeting of Anesthetic and Analgesic Drug Products Advisory Committee and Drug Safety and Risk Management Advisory Committee. 2016. FDA Briefing Document. 236 p.
4. Piper B. J., Shah D. T., Simoyan O. M., McCall K. L., Nichols S. D. Trends in Medical Use of Opioids in the U.S., 2006–2016 // Am J Prev Med. 2018. P. 1–9.
5. Соснов А. В., Семченко Ф. М., Власов М. И., Тохмахчи В. Н., Соснова А. А. Развитие комплексной фармакотерапии сильной и средней боли. Ч. 1. Мультицелевое комбинирование опиоидов и ненаркотических анальгетиков центрального действия // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 176–187. [Sosnov A. V., Semchenko F. M., Vlasov M. I., Tohmahchi V. N., Sosnova A. A. Razvitie kompleksnoi farmakoterapii sil'noi i srednei boli. Ch. 1. Mul'titargetnoe kombinirovanie opioidov i nenarkoticheskikh anal'getikov tsentral'nogo deistviya // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Development of complex pharmacotherapy of severe and moderate pain. Part 1. Multitargeted combination of opioids and non-opioid analgesics with central effects // Drug Development & Registration. 2017. № 2(19). P. 176–187].
6. Наркомания, преступность и мятежники. Транснациональная угроза афганского опия. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). 2009. 23 с. [Narkomaniya, prestupnost'

- i myatezhniki. Transnatsional'naya ugroza afganskogo opiya. [Afghanistan Opium Survey. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)]. 2009. 23 p.]
7. *Бескараваяная Т.* Наркотические анальгетики в России получают не более 7–8% нуждающихся // *Медвестник*. 16.06.2015. [Beskaravainaya T. Narkoticheskie anal'getiki v Rossii poluchayut ne bolee 7–8% nuzhdayushchikhsya. [Narcotic analgesics in Russia receive no more than 7–8% patients of those in need] // *Medvednik*. 06.16.2015].
 8. *Кононова С. В., Лебедева М. В.* Анализ лекарственного обеспечения онкологических больных наркотическими анальгетиками в амбулаторных условиях в Нижегородской области // *Фармация и фармакология*. 2015. № 4(11). С. 43–46. [Kononova S. V., Lebedeva M. V. Analiz lekarstvennogo obespecheniya onkologicheskikh bol'nykh narkoticheskimi anal'getikami v ambulatornykh usloviyakh v Nizhegorodskoi oblasti // *Farmatsiya i farmakologiya* [Analysis of drug provision for oncological patients with narcotic analgesics in outpatient settings in the Nizhny Novgorod region // *Pharmacy and Pharmacology*]. 2015. № 4(11). P. 43–46].
 9. *Соснов А. В., Голубев С. С., Пункевич Б. С., Садовников С. В., Семченко Ф. М., Тохмахчи В. Н., Соснова А. А.* Оценка потребности российской федерации в сильнодействующих анальгетиках // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. № 2(15). С. 202–215. [Sosnov A. V., Golubev S. S., Punkevich B. S., Sadovnikov S. V., Semchenko F. M., Tohmahchi V. N., Sosnova A. A. Otsenka potrebnosti rossiskoi federatsii v sil'nodeistvuyushchikh anal'getikakh // *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. [Assessment of the Russian Federation requirement in potent analgesics // *Drug Development & Registration*]. 2016. № 2(15). P. 76–187].
 10. FDA Analysis of Long-Term Trends in Prescription Opioid Analgesic Products: Quantity, Sales, and Price Trends / FDA Report. 2018. P. 1–12.
 11. CDC Provisional Drug Overdose Death Counts. Available at: <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm> (accessed 05.07.2018).
 12. *Katz J.* The First Count of Fentanyl Deaths in 2016: Up 540% in Three Years. *The New York Times*. 02.09.2017. Available at: <https://www.nytimes.com/interactive/2017/09/02/upshot/fentanyl-drug-overdose-deaths.html> (accessed 14.05.2018).
 13. NIH launched the HEAL Initiative. USA NIH. 2018. Available at: <https://www.nih.gov/research-training/medical-research-initiatives/heal-initiative> (accessed 14.05.2018).
 14. FDA Opioids Action Plan. USA FDA. 2017. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/ucm484714.htm> (accessed 18.05.2018).
 15. *Volkow N., Collins F.* The Role of Science in Addressing the Opioid Crisis // *New England Journal of Medicine*. 2017. V. 377(4). P. 391–394.
 16. *Chan S., McCarthy D., Li J., Palczewski K., Yuan Sh.* Designing Safer Analgesics via μ -Opioid Receptor Pathways // *Trends Pharmacol Sci*. 2017. V. 38(11). P. 1016–1037.
 17. *Manglik A., Lin H., Aryal D., Shoichet B.K. et al.* Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects // *Nature*. 2016. V. 537(7619). P. 185–190.
 18. *Viscusi E. R., Webster L., Kussc M., Daniels S., Bolognesi J. A., Zuckerman S., Soergele D.G., Subache R. A., Cooke E., Skobierandae F.* A randomized, phase 2 study investigating TRV130, a biased ligand of the m-opioid receptor, for the intravenous treatment of acute pain // *Pain*. 2016. V. 157(1). P. 264–272.
 19. *Roth B. L., Irwin J. J., Shoichet B. K.* Discovery of new GPCR ligands to illuminate new biology // *Nature Chem. Biology*. 2017. V. 13 (11). P. 1143–1151.
 20. *Soergel D. G., Subach R. A., Burnham N., Lark M. W., James I.E., Sadler B. M., Skobieranda F., Violin J. D., Webster L. R.* Biased agonism of the m-opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects vs morphine: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy volunteers // *Pain*. 2014. V. 155. P. 1829–35.
 21. *Siuda E. R., Carr R., Rominger D. H., Violin J. D.* Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics // *Neurosciences. Current Opinion in Pharmacology*. 2017. V. 32. P. 77–84.
 22. *Ok H. G., Kim S. Y., Lee S. J., Kim T. K., Huh B. K., Kim K. H.* Can oliceridine (TRV130), an ideal novel receptor G protein pathway selective (GPS) modulator, provide analgesia without opioid-related adverse reactions? // *Korean J Pain*. 2018. V. 31(2). P. 73–79.
 23. *Mori T., Kuzumaki N., Arima T. et al.* Usefulness for the combination of G-protein- and β -arrestin-biased ligands of μ -opioid receptors: Prevention of antinociceptive tolerance // *Mol Pain*. 2017. V. 13. P. 1–9.
 24. Глава ФСКН насчитал в России 7 млн наркоманов // *BBC News. Русская служба*. 26.06.2015. [Glava FSKN naschital v Rossii 7 mln narkomanov. *BBC News. Russkaya sluzhba*. 26.06.2015. [The head of the Federal Drug Control Service counted 7 million drug addicts in Russia // *BBC News. Russian service*]. Available at: https://www.bbc.com/russian/russia/2015/06/150626_drug_addicts_number (accessed 14.05.2018).
 25. *Reichle C. W., Smith G. M., Gravenstein J. S., Macris S. G., Beecher H. K.* Comparative analgesic potency of heroin and morphine in postoperative patients // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1962. V. 136 (1). P. 43–46.
 26. Судебно-медицинская оценка токсичности опиоидов у взрослых и детей с персистирующей болью: Методические рекомендации / ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2015. М. 59 с. [Sudebno-meditsinskaya otsenka toksichnosti opioidov u vzroslykh i detei s persistiruyushchei bol'yu: Metodicheskie rekomendatsii / FGBU «Rossiskii tsentr sudebno-meditsinskoi ekspertizy» Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. [Guidelines. Forensic assessment of the toxicity of opioids in adults and children with persistent pain / FGBU «Russian Center for Forensic Medical Examination» of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2015. Moscow. 59 p.]
 27. Публикации в порядке обсуждения направлений развития анальгетиков в РФ. (А) Мантуров: для выращивания опийных растений в РФ требуется 200 га земли в южном регионе // ТАСС. 01.07.2017. [Publikatsii v porядке obsuzhdeniya napravlenii razvitiya anal'getikov v RF. (A) Manturov: dlya vyrashchivaniya opiinykh rastenii v RF potrebuetsya 200 ga zemli v yuzhnom regione [Publications in the order of discussion in directions of analgesics development in the Russian Federation. (A) Manturov: 200 hectares of land in the southern region will be needed for the cultivation of opium plants in the Russian Federation] // TASS. 01.07.2017]. Available at: <http://tass.ru/ekonomika/4299391> (accessed 24.05.2018); (Б) Ростех готов производить лекарства из субстанций с содержанием опиатов // ТАСС. 10.08.2017. [(B) Rostekh gotov proizvodit' lekarstva iz substantsii s sodержaniem opiatov. (B) Rostech is ready to produce medicines from substances containing opiates] // TASS. 08/10/2017]. Available at: <http://tass.ru/obschestvo/4397683> (accessed 24.05.2018).
 28. *Amini M.* Afghanistan's relentless opium woes have a 'new seed in town, and it comes from China. *World News. CNBC*. 25.03.2017. Available at: <https://www.cnbc.com/2017/03/24/afghanistans-relentless-opium-woes-have-a-new-seed-in-town-and-it-comes-from-china.html> (accessed 24.05.2018).
 29. *Соснов А. В., Садовников С. В., Семченко Ф. М., Руфанов К. А., Тохмахчи В. Н., Соснова А. А., Турин И. А.* Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. № 1(14). С. 196–206. [Sosnov A. V., Sadovnikov S. V., Semchenko F. M., Rufanov K. A., Tohmahchi V. N., Sosnova A. A., Tyurin I. A. Sil'nodeistvuyushchie nenarkoticheskie anal'getiki kak napravlenie razvitiya farmatsevtiki // *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2016. № 1(14). С. 196–206.

- narkoticheskie anal'getiki kak napravlenie razvitiya farmatsevtiki // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Strong-acting non-narcotic analgesics as direction of development of pharmaceuticals // Drug Development & Registration]. 2016. № 1(14). P. 196–206.
30. White J., Irvine R. Mechanisms of fatal opioid overdose // *Addiction*. 1999. V. 94(7). P. 961–972.
 31. Breslow J., Monrow A., Daly J., Meissier J., Gauyhan J., Alder M., Eisenstein T. Morphine not trauma sensitizes to systemic Acinetobacter baumannii infection // *J NeurolImmune Pharmacol*. 2011. V. 6(4). P. 551–65.
 32. Morphine-Induced Immunosuppression, From Brain to Spleen. NIDA. Available at: <https://www.drugabuse.gov/news-events/nida-notes/2008/06/morphine-induced-immunosuppression-brain-to-spleen> (accessed 24.05.2018).
 33. Sacerdote P., Franchi S., Panerai A. E. Non-analgesic effects of opioids: mechanisms and potential clinical relevance of opioid-induced immunodepression // *Curr Pharm Des*. 2012. V. 18(37). P. 6034–42.
 34. Bimonte S., Barbieri A., Rea D. et al. Morphine Promotes Tumor Angiogenesis and Increases Breast Cancer Progression // *BioMed Research International*. 2015. V. 2015. Article ID 161508. P. 1–8.
 35. Gupta K., Kshirsagar S., Chang L. et al. Morphine Stimulates Angiogenesis by Activating Proangiogenic and Survival-promoting Signaling and Promotes Breast Tumor Growth // *Cancer Research*. 2002. V. 62. P. 4491–4498.
 36. DiDonato K., Palmer P.P., Morris T.E., Walker J., Casamayor M., Hennebert M. Intravenous administration of morphine in the emergency room inflicts a substantial economic burden in the EU5. ISPOR 19th Annual European Congress. 2016. Poster PSY45.
 37. Kane-Gill S. L. The cost of opioid-related adverse drug events // *Journal of pain & palliative care pharmacotherapy*. 2014. V. 28(3). P. 282–293.
 38. Report of the International Narcotics Control Board on the Availability of Internationally Controlled Drugs: Ensuring Adequate Access for Medical and Scientific Purposes. 2010. Available at: http://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2010/Supplement-AR10_availability_English.pdf (accessed 24.05.2018).
 39. Williams A., Baird E. Special Considerations for the Treatment of Pain from Torture and War // *Curr Anesthesiol Rep*. 2016. V. 6. P. 319–326.
 40. Rankovic Zoran. CNS Drug Design: Balancing Physicochemical Properties for Optimal Brain Exposure // *J. Med. Chem*. 2015. V. 58 (6). P. 2584–2608.
 41. Andrés A., Rosés M., Ràfols C., Bosch E., Espinosa S., Segarra V., Huerta J. M. 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.
 42. Morgan R. W., Nicholson K. L. Characterization of the Antinociceptive Effects of the Individual Isomers of Methadone Following Acute and Chronic Administration // *Behav Pharmacol*. 2011. V. 22(5–6). P. 548–57.
 43. Weltrowskaa G., Lemieux C., Chunga N. N., Guo J. J., Wilkesa B. C., Schiller P. W. Carba-carfentanil (trans isomer): a μ opioid receptor (MOR) partial agonist with a distinct binding mode // *Bioorg Med Chem*. 2014. V. 22(17). P. 4581–4586.
 44. Thompson R. G., Menking D., Valdes J. J. Opiate receptor binding properties of carfentanil. CRDEC Aberdeen Proving Ground. 1987. P. 1–20.
 45. Mandema J. W., Stanski D. R. Population pharmacodynamic model for ketorolac analgesia // *Clin Pharmacol Ther*. 1996. V. 60(6). P. 619–635.
 46. Critical review of Ketamine 34th ECDD 2006/4.3. Available at: <https://www.drugbank.ca/unearth/q?utf8=%E2%263A> (accessed 24.05.2018).
 47. Volpe D. A., McMahon Tobin G. A., Melton R. D., Katki A. G., Parker R. J., Colatsky T., Kropp T. J., Verbois S. L. Uniform assessment and ranking of opioid μ receptor binding constants for selected opioid drugs // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2011. V. 59. P. 385–390.
 48. Zhang B., Zhang T., Sromek A. W., Scrimale T., Bidlack J. M., Neumeyer J. L. 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.
 49. Mather L. E. Opioids: a pharmacologist's delight // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1995. V. 22. P. 833–836.
 50. LogD Predictor. ChemAxon. Available at: <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/> (accessed 24.05.2018).
 51. Medzihradsky F., Emmerson P. J., Mousigian C. A. Lipophilicity of Opioids Determined by a Novel Mic-romethod // *JPM*. 1992. V. 27 (2). P. 67–69.
 52. DrugBank database. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs> (accessed 24.05.2018).
 53. Small Animal Toxicology / Ed. by Peterson M.E. and Talcott P.A. 2006. 1190 p.
 54. Bostro E., Hammarlund-Udenaes M., Simonsson U. S. H. Blood-Brain Barrier Transport Helps to Explain Discrepancies in In Vivo Potency between Oxycodone and Morphine // *Anesthesiology*. 2008. V. 108. P. 495–505.
 55. MacKenzie M., Zed P. J., Ensom M. H. H. Opioid Pharmacokinetics-Pharmacodynamics: Clinical Implications in Acute Pain Management in Trauma // *Annals of Pharmacotherapy*. 2016. P. 1–10
 56. Vuyk J., Schraag S. Advances in Modelling and Clinical Application of Intravenous Anaesthesia. – Springer Science & Business Media. 2012. 280 p.
 57. Steagall P. V. M., Pelligand L., Giordano T., Auberger C., Sear J. W., Luna S. P. L., Taylor P. M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of intravenous, intramuscular and subcutaneous buprenorphine in conscious cats // *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2013. V. 40(1). P. 83–95.
 58. Martini C.H., Olofsen E., Yassen A., Aarts L., Dahan A. Pharmacokinetic-pharmacodynamics modelling in acute and chronic pain: an overview of the recent literature // *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011. V. 4(6). P. 719–728.
 59. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. 11th ed. / Ed. by R.J. Lewis. (Lewis Information Systems, Inc.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2004.
 60. Рудько О. И., Климов Е. А., Соболев В. В., Соснов А. В., Руфанов К. А., Семченко Ф. М. Исследование влияния интраназального введения препарата дексметомидин на болевую чувствительность // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 238–243. [Rudko O. I., Klimov E. A., Sobolev V. V., Sosnov A. V., Rufanov K. A., Semchenko F. M. Issledovanie vliyaniya intranazal'nogo vvedeniya preparata deksetomidin na boleuyu chuvstvitel'nost' // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [The study of effects of the intranasal dexmedetomidine administration on pain sensitivity // Drug Development & Registration]. 2017. № 2(19). P. 238–243].
 61. Wolf R. W. Army Medicine Fighting Opioid Overuse for a Decade. Army Medicine. 09.01.2018. Available at: https://www.army.mil/article/198922/army_medicine_fighting_opioid_overuse_for_a_decade (accessed 24.05.2018).
 62. Experimental Vaccine Blocks Effects of Heroin in Mice. US Military's HIV Research Program (MHRP). Available at: <https://www.hivresearch.org> (accessed 24.05.2018).
 63. Baumann M., Pasternak G. Novel Synthetic Opioids and Overdose Deaths: Tip of the Iceberg? // *Neuropsychopharmacology*. 2018. V. 43. P. 216–217.
 64. Уйба В. В., Криворотов Д. В., Радиллов А. С., Рембовский В. Р., Дулов С. А., Кузнецов В. А., Ерофеев Г. Г., Мартинович Н. Н., Соснов А. В. Антагонисты опиоидных рецепторов. От настоящего к будущему // Медицина экстремальных состояний. 2018. В печати. [Uyba V. V., Krivorotov D. V., Zabelin M. V., Radilov A. S., Rembovskiy V. R., Dulov S. A., Kuznetsov V. A., Erofeev G. G., Martinovitch N. N., Sosnov A. V. Antagonisty opioidnykh retseptorov. Ot nastoyashchego k budushchemu // Meditsina ekstremal'nykh sostoyanii. [Opioid receptor antagonists. From the present to the future // Medicine of extreme conditions]. 2018. In press.]

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 (катализом). Образец вводится до заполнения всего объема колонки и на резервуары подается 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 (ВxШxД)
Вес	20 кг
Мощность	120-230 VAC, 50/60 Гц

УДК 615.322

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИТОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ПРИ НАРУШЕНИЯХ ЖИРОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНОВ

М. Н. Пovyдыш^{1*}, В. Г. Лужанин¹, Д. Ю. Ивкин¹, М. В. Белоусов², Г. П. Яковлев¹

Резюме. В обзоре приведено описание и результаты первого этапа фитотерапевтического поиска – сбора информации о перспективных видах лекарственного растительного сырья (ЛРС), суммарных извлечениях и индивидуальных веществах растительного происхождения, которые обладают выраженной фармакологической активностью при нарушениях жирового и углеводного обмена, в том числе при ожирении, сахарном диабете 2 типа (СД2), метаболическом синдроме (МС) и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), подтвержденной в доклинических и/или клинических исследованиях.

Ключевые слова: лекарственное растительное сырьё, метаболический синдром, индивидуальные вещества растительного происхождения.

PROSPECTS OF USING PHYTOTHERAPY AT DISORDERS OF FAT AND CARBOHYDRATE METABOLISM

M. N. Povydysh^{1*}, V. G. Luzhanin¹, D. Yu. Ivkin¹, M. V. Belousov², G. P. Yakovlev¹

Abstract. The review describes the first stage of phyto-pharmacological screening. It includes literature data analysis on promising species of medicinal plant raw materials, total extracts and individual substances of plant origin with pronounced pharmacological activity in disorders of fat and carbohydrate metabolism, incl. obesity, diabetes mellitus type 2, metabolic syndrome, and non-alcoholic fatty liver disease, confirmed in preclinical and/or clinical trials.

Keywords: medicinal plant raw materials, metabolic syndrome, individual substances of plant origin.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14

2 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634055, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: maria.povydysh@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения жирового и углеводного обмена лежат в основе таких социально значимых патологий, как сахарный диабет 2 типа, ожирение, метаболический синдром, жировая болезнь печени. Ассортимент лекарственных средств для терапии данных видов патологий на фармацевтическом рынке Российской Федерации ограничен: так, для пациентов с избыточным весом выбор сводится к трём основным препаратам – сибутрамину, орлистату и лираглутиду, однако коморбидность, в том числе кардиоваскулярные риски для сибутрамина, лимитируют и их применение.

Актуальность использования фитотерапевтических средств в лечении и профилактике нарушений жирового и углеводного обмена не представляет сомнений. В целом интерес к растениям как источникам новых лекарственных веществ в настоящее время весьма высок. Так, за период с 1981 по 2016 годы среди всех зарегист-

рированных новых лекарственных средств доля средств растительного происхождения составила 33% [1]. По проведенным оценкам, 20–25% всех препаратов, упомянутых в мировых фармакопеях, происходят из природных источников независимо от того, используются они в виде нативных природных соединений или с небольшими химическими модификациями. Фактически около 50% фармацевтических препаратов производятся на основе соединений, впервые идентифицированных или выделенных из растений [2].

В свете вышесказанного существует возможность применения фитопрепаратов как в монотерапии, так и в качестве аддитивного компонента в дополнение к средствам базовой терапии, в связи с чем становится актуальным поиск данных о перспективном ЛРС. Отсутствие достаточной сырьевой базы лекарственных растений в развитых странах привело к тому, что все большую роль в разработке новых субстанций раститель-

Таблица 1.

Этапы направленного фитотерапевтического поиска

<p>I этап. Выбор целевых видов лекарственных растений</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Поиск информации о видах лекарственных растений, применяемых в народной медицине при заданной патологии. 2. Анализ научной информации об экспериментально подтвержденной фармакологической активности фитопрепаратов, суммарных экстрактов, индивидуальных соединений растительного происхождения.
<p>II этап. Подготовка субстанций для фармакологических исследований.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Интродукция лекарственных растений, селекция с целью повышения содержания целевых фитоконпонентов. 2. Заготовка ЛРС. 3. Получение суммарных экстрактов, выделение очищенной суммы веществ или индивидуального вещества растительного происхождения. 4. При возможности – проведение химической модификации или направленного синтеза целевых компонентов.
<p>III этап. Исследование фармакологической активности</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Фармакологический скрининг целевых компонентов (<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>). 2. Исследование эффективности и безопасности наиболее перспективных лекарственных кандидатов. 3. Составление протоколов доклинических исследований.

ного происхождения играют страны Азии. Наибольшая доля исследований в области лекарственных растений в мире приходится на долю Китая (24%), Индии (12%), Малайзии (11%). Международные базы данных научной информации содержат по большей части сведения о лекарственных растениях, произрастающих в странах с тропическим и субтропическим климатом и не интродуцируемых в условиях России.

План развития до 2035 г. направления «Превентивная медицина» в рамках дорожной карты HealthNet предусматривает создание сети из не менее чем 3,5 тыс. центров превентивной медицины. Центральное место в этом плане отведено развитию индустрии натуральных профилактических лекарственных средств и БАД: возрождению в России лекарственного растениеводства и производства растительных персонализированных средств коррекции. Последнее основано на наличии в России огромных экологически чистых территорий, пригодных для выращивания порядка 70% растительного сырья для производства фитопрепаратов. Богатейшие природные ресурсы (более 10000 дикорастущих и несколько сотен культивируемых видов), многолетний опыт исследований в области лекарственных растений и богатые традиции народной медицины России представляют огромный потенциал для изыскания новых растительных объектов.

Актуальным является создание фармацевтических субстанций растительного происхождения в виде индивидуальных соединений и их очищенных комплексов с последующим определением их безопасности и эффективности в отношении нарушений жирового и углеводного обменов (таблица 1). Данный подход подкреплён многообразием активных соединений, входящих в состав лекарственного растительного сырья, возможностями компьютерного скрининга и фармакологического эксперимента.

Целью настоящего обзора является выявление перспективных лекарственных растений, извлечения и индивидуальные химические компоненты которых в эксперименте проявляют гипохолестеринемическую, гиполипидемическую, гипогликемическую и другие виды биологической активности, ценные для дальнейшей разработки на их основе средств для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов, то есть реализация первого этапа фитотерапевтического поиска с целью дальнейшей реализации этапов второго и третьего.

Выделение индивидуальных биологически активных веществ и их очищенных комплексов из растительного сырья с последующим определением их безопасности и специфической активности является перспективным подходом к созданию лекарственных препаратов природного происхождения. В отношении нарушений обмена веществ индивидуальные вещества часто имеют значительно более высокую эффективность по сравнению с суммарными экстрактами [3].

Перечень лекарственных растений, применяемых в народной медицине в качестве антидиабетических средств, достаточно обширен, но наиболее широко используются *Cichorium intybus* L. (Asteraceae), *Galega officinalis* L. (Fabaceae), *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) и др. [4]. Для некоторых растительных компонентов активность, направленная на коррекцию нарушений жирового и углеводного обмена, была подтверждена экспериментально, а также в ряде случаев установлены ее механизмы. Данные о наиболее изученных в этом отношении лекарственных растениях приведены ниже.

1. *Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Fisch. (Fabaceae) – верблюдья колючка обыкновенная.

Сумма полимерных проантоцианидинов из травы *Alhagi pseudalhagi* оказывает гипохолестеринемическое и гиполипидемическое действие, этанольный экстракт травы — гиполипидемическое, полисахаридный комплекс из травы — антигипоксическое [5, 6].

2. *Galega officinalis* (Fabaceae) – козлятник аптечный, или галега лекарственная.

Очищенный от алкалоидов экстракт галеги, содержащий фитол и флавоноиды, оказывает антиоксидантное и антирадикальное действие за счет ингибирования ПОЛ и протеинов на модели стрептозотозиндуцированного диабета у крыс [7]. Порошок листьев галеги, водный экстракт и галегин

оказывают гипогликемическое действие на модели стрептозотоцининдуцированного диабета у крыс [8, 9]. Гуанидин, выделенный из экстракта галеги, увеличивает активность АМР-активированной протеинкиназы и увеличивает активность GLUT4 (белок – переносчик глюкозы) и обратный захват глюкозы [10]. Экстракт галеги оказывает стимулирующее действие на PPAR γ (рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами), которые играют важную роль в адипогенезе и гомеостазе глюкозы [11]. Водно-спиртовые экстракты надземной части, галегин и его аналоги снижают массу тела экспериментальных животных [12–14].

3. *Trigonella foenum-graecum* L. (Fabaceae) – пажитник сенной.

Галактоманнаны семян пажитника оказывают антидиабетическое (гипогликемическое) действие, уменьшая уровень глюкозы параллельно с сокращением ответа инсулина после принятия пищи. Эффект уменьшения уровня глюкозы после принятия пищи наблюдался у пациентов с инсулиннезависимым диабетом при добавлении семян пажитника в ежедневный рацион питания. Механизмы, лежащие в основе данного эффекта, возможно, связаны с присоединением молекул сахара к галактоманнам и с дальнейшим уменьшением их всасывания в желудочно-кишечном тракте. Гипогликемический эффект пажитника также связывают с наличием свободной аминокислоты 4-гидроксиизолейцина, который в эксперименте вызывает стимуляцию бета-клеток поджелудочной железы. Галактоманнаны и сумма стероидных сапонинов пажитника греческого значительно уменьшают уровень холестерина в плазме крови, а также способствуют снижению синтеза холестерина в печени [15].

4. *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae) – шлемник байкальский.

Экстракт, а также флавоноиды байкалин, байкалеин и вогонин из корней *Scutellaria baicalensis* обладают гиполипидемическими свойствами, экстракт и порошок корней (в составе диеты) – гипохолестеринемическими, этанольный экстракт и байкалин – гипогликемическими, экстракт и байкалин – антигипоксическими, флавоноиды листьев также способны ингибировать α -глюкозидазу (байкалин, байкалеин, вогонин, хризин и ороксиллин А), байкалеин ингибирует аккумуляцию триглицеридов в процессе адипогенеза [16].

5. *Phaseolus vulgaris* – фасоль обыкновенная.

Стандартизованный экстракт семян фасоли в дозе 500–3000 мг/день в клинических испытаниях на пациентах с сахарным диабетом и ожирением показал гипогликемический эффект и эффект снижения веса за счет ингибирования α -амилазы и α -глюкозидазы [17]. Стандартизованный экстракт семян при испытании на здоровых добровольцах вызывает статистически значимое снижение уровня глюкозы и повышение уров-

ня инсулина [18]. Экстракт семян, содержащий большое количество фенольных соединений, достоверно снижает активность α -амилазы и липазы [19]. Сумма пептидов, выделенная из протеинов семян, оказывает выраженное ингибирующее действие на активность α -амилазы и α -глюкозидазы [20]. При добавлении экстракта семян в пищу крысам со стрептозотоцининдуцированным диабетом наблюдалось уменьшение уровня глюкозы в крови, снижение уровня альбумина в моче и увеличение креатининового клиренса. Механизм действия связан с увеличением экспрессии ряда генов (Glu1, Cps1, Ipmk и др.), ответственных за выведение аммонийных групп и устойчивость к оксидативному стрессу [21]. Водный экстракт створок плодов снижал уровень глюкозы в крови, увеличивал активность гликогенсинтазы и гексокиназы и количество белка GLUT-4 (инсулинзависимый транспортер глюкозы) в мышечной ткани у крыс с моделью инсулинзависимого диабета. Применение фазеоламина (Phase2) в дозах 100–1500 мг/кг в течение 20 дней *in vitro* и *in vivo* у здоровых крыс и на модели стрептозотоцининдуцированного диабета снижает активность α -амилазы, понижает уровень глюкозы, снижает риск возникновения почечных и печеночных осложнений при диабете. Экстракт семян снижает уровень фактора некроза опухоли α и повышает уровень адипонектина у клеточной линии адипоцитов [22].

6. *Arctium lappa* L. (Asteraceae) – лопух большой.

Арктигеновая кислота из плодов *Arctium lappa* L. оказывает гипогликемическое действие; арктиин семян снижает выраженность диабетической ретинопатии, сопутствующей стрептозотоцининдуцированному диабету, арктигенин активизирует поглощение глюкозы мышцами и ингибирует глюконеогенез и липогенез в гепатоцитах за счет увеличения активности AMPK [23].

7. *Trifolium pratense* L. (Fabaceae) – клевер луговой.

Изофлавоны из надземной части *Trifolium pratense* L. в эксперименте проявляют гипохолестеринемическое и антиатеросклеротическое действие [24], сумма изофлавонов, в том числе биоханин, снижает уровень холестерина низкой плотности у мужчин. В эксперименте формонетин, сухой экстракт и спиртовой экстракт семян обладают антиоксидантными свойствами, изофлавоны в составе диеты – гипохолестеринемическими, антиатеросклеротическими, экстракт – гиполипидемическими [25].

8. *Polemonium caeruleum* L. (Polemoniaceae) – синюха голубая.

Сапонины *Polemonium caeruleum* L. обладают гипохолестеринемической и гиполипидемической активностью [26].

Обобщая вышеизложенное, можно определить ряд биологически активных веществ, обладающих выраженной фармакологической активностью в отно-

шении нарушений жирового и углеводного обмена и наиболее перспективных для выделения из лекарственных растений (таблица 2).

Большинство перечисленных видов широко представлено во флоре России и имеет достаточно богатую базу для заготовки сырья от дикорастущих растений: *T. pratense*, *A. pseudalhari* и др., многие введены в культуру в качестве пищевых растений и источников лекарственного растительного сырья: *A. sativa*, *T. foenum-graecum*, *Ph. vulgaris*, *P. caeruleum* и др.

Ряд растительных компонентов в эксперименте проявляет гепатопротекторное, антиоксидантное, гипотензивное, мембраностабилизирующее действие, улучшает эндотелиальную функцию, окислительно-восстановительную функцию и чувствительность к инсулину, что может использоваться в комплексной терапии нарушений жирового и углеводного обмена, учитывая коморбидный характер данных патологий.

На модели высокожировой диеты у крыс М. Душкин с соавт. показали, что экстракт левзеи сафлоровидной в дозе 300 мг/кг может предотвращать развитие МС и улучшать симптоматику за счёт комплексного положительного воздействия на абдоминальное ожирение, непереносимость глюкозы, дислипидемию, гепатоз, уровни кортикостерона и провоспалительного цитокина без видимых признаков или симптомов токсичности, что указывает на высокий уровень безопасности. Показатели эффективности испытуемого экстракта превысили таковые у экстрактов *Glycyrrhiza glabra* и *Punica granatum*, обогащенных глицирризиновой и эллаговой кислотами [27].

Зачастую у пациентов с метаболическим синдромом имеется неалкогольная жировая болезнь печени (30–40% случаев). В обзоре М. Vagherya с соавт. показана эффективность при НАБЖП растений и индивидуальных веществ растительного происхождения, таких как семя льна, корица, зеленый чай, солодка, чеснок, оливковое масло и масла канолы, ресвератрол, антоцианин, куркумин, силимарин/силибин, берберин, дигидромирицентин [28]. В данном обзоре также представлена информация о растениях, актуальных лишь для Китая. В работе Ya-Ling Liu и соавт. показана схожая эффективность для экстракта листьев *Rhododendron oldhamii*, связанная с выраженным антиоксидантным эффектом [29].

Описано исследование эффективности применения корня астрагала (*Astragali Radix*) для защиты сердечной и нефротической функций пациентов с гипертонической болезнью и метаболическим синдромом. Было отобрано 226 пациентов с коморбидностью в возрасте старше 18 лет. Пациенты были случайным образом разделены на контрольную группу (базовая терапия) и 2 группы пациентов, получавших, кроме обычного лечения, капсулы с корнем астрагала в двух терапевтических дозах. Геометрию миокарда, систолическую и диастолическую функции оценивали с помощью М-режима эхокардиографии, двумерной эхокардиографии, доплера, уровень микроальбуминурии оценивали с помощью радиоиммуноанализа, рассчитывали скорость клубочковой фильтрации. Изменения соответствующих показателей сердечной и почечной функций до и после лечения были сопоставлены в те-

Таблица 2.

Обобщение литературных данных о ЛРС с обширной сырьевой базой в РФ

Объект	Вид сырья	Выделяемое БАВ (группа)	Фармакологическое действие
Верблюжья колючка обыкновенная – <i>Alhagi pseudalhagi</i>	Трава	Сумма антоцианов	Гипохолестеринемическое, гиполипидемическое
Козлятник лекарственный – <i>Galega officinalis</i>	Олиственные цветоносные верхушки	Галегин	Гипогликемическое
Клевер луговой – <i>Trifolium pratense</i>	Трава	Изофлавоны	Гипохолестеринемическое, антиатеросклеротическое
Лопух большой – <i>Arctium lappa</i>	плоды	Арктигеновая кислота	Гипогликемическое
Пажитник сенной – <i>Trigonella foenum-graecum</i>	семена	Σ галактоманнанов и 4-гидроксиизолейцин	Гипогликемическое
		Σ галактоманнанов и Σ стероидных сапонинов	Гипохолестеринемическое
Синюха голубая – <i>Polemonium caeruleum</i>	Корневища с корнями	Сапонины	Гипохолестеринемическое, гиполипидемическое
Фасоль обыкновенная – <i>Phaseolus vulgaris</i>	Створки плодов и семена	Сумма пептидов	Ингибирование α-амилазы и α-глюкозидазы
		Сумма флавоноидов и сапонинов из семенной кожуры	Уменьшение печеночного липогенеза, снижение отложения жира в гепатоцитах
		Цикотибозид	Гепатопротекторное
Шлемник байкальский – <i>Scutellaria baicalensis</i>	Корни	Инулин	Гепатопротекторное
		Байкалин, байкалеин, вогонин;	Гепатопротекторное
	Листья	Байкалин	Гипогликемическое
		Байкалин, байкалеин	Фибринолитическое, гиполипидемическое

чение 12-месячного наблюдения. После лечения были улучшены конечный систолический объем левого желудочка и конечный систолический размер левого желудочка у всех пациентов. После добавления *Astragal Radix* скорость митрального потока у пациентов была в некоторой степени улучшена ($P < 0,05$). *Astragal Radix* оказал значительное влияние на снижение микроальбуминурии ($P < 0,05$). Был сделан вывод о том, что по сравнению с традиционной терапией *Astragal Radix* в сочетании с ней может улучшить состояние миокарда, систолическую функцию левого желудочка, диастолическую функцию левого желудочка и уменьшить микроальбуминурии в определенной степени у пациентов с артериальной гипертензией и метаболическим синдромом [30].

G. Chiva-Blanch и L. Badimon в обзоре клинических исследований эффективности полифенольных соединений при метаболическом синдроме описывают применение полифенолов из зелёного чая, черники, фруктов, овощей, орехов, экстракта виноградных косточек, красного вина. Показано, что ягоды очень богаты антоцианинами, преобладающими являются пеларгонидин, цианидин, дельфинидин, петунидин, пеонидин и мальвидин. Рандомизированные исследования, анализирующие эффект потребления ягод (свежих, сока или экстрактов), выполняются в относительно короткий срок, и поэтому их долгосрочные эффекты все еще остаются неизвестными. Было показано, что потребление черники снижает артериальное давление и улучшает эндотелиальную функцию, окислительно-восстановительную функцию и чувствительность к инсулину у пациентов с МС. Подобные исследования проведены с использованием клюквы и гранатового сока [31]. Показаны положительные свойства плодов клубники при МС (положительное влияние на постпрандиальную гипергликемию и метаболизм, а также снижение уровня молекул адгезии-1, гликированного гемоглобина и холестерина, противовоспалительное действие и антигипертензивная активность, связанная с уменьшением объема циркулирующей крови) за счёт фенольных соединений в их составе – производных пеларгонидина и цианидина, кемпферола, физетина, эллаговых и галловых кислот [32].

В статье Н. М. Ауоуб с соавт. показана эффективность антоцианов фиолетового картофеля и фиолетовой моркови при МС в доклинических исследованиях на крысах линии Zucker с ожирением и диабетом [33].

Схожие результаты получены относительно антоцианов, выделенных из аронии черноплодной и пурпурной кукурузы, в доклинических исследованиях на крысах с алиментарным МС [34].

Даже для листьев стевии, которые использовали ранее лишь в качестве заменителя сахара, в последних исследованиях показаны положительные плейотропные эффекты за счёт наличия антиоксидантной, антистрессовой и мембраностабилизирующей активностей [35]. С наличием в составе ЛРС рода стевии, по-

мимо стевиозида, обуславливающего сладкий вкус, ди- и тритерпенов, стигмастерола, танина, аскорбиновой кислоты, алкалоидов, стероидов, сапонинов, β -каротина, хрома, кобальта, магния, железа, калия, фосфора, рибофлавина, тиамина, олова, цинка, апигенина, аустронилина, β -ситостерола, кофеиновой кислоты, кемпферола, кариофиллена, кентауреидина, хлорогеновой кислоты, хлорофилла, кемпферола, лютеолина и кверцетина связывают целый ряд фармакологических активностей, включая антацидные, кардиотонические, противокариесные, противовирусные, антибактериальные, антигипертензивные, противогрибковые, противовоспалительные, мочегонные, антиоксидантные, гипотензивные, антигиперлипидемические и противоопухолевые свойства. Кроме того, его гиполлипидемические и инсулинотропные эффекты способствуют лечению диабета типа 2, стимулируя секрецию инсулина бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, что характерно для секретогогов [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выполнен первый этап фитотерапевтического поиска – поиск и анализ информации. Проведённый обзор литературных источников, отечественных и зарубежных, позволяет наметить перспективные для дальнейшей экспериментальной практической работы виды лекарственного растительного сырья, суммарные комплексы и индивидуальные вещества растительного происхождения, в первую очередь фенольные производные, эффективные при нарушениях жирового и углеводного обменов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 // *J. Nat. Prod.* 2016. Т. 79. № 3. P. 629–661.
2. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. The influence of natural products upon drug discovery // *Natural product reports.* 2000. V. 17. № 3. P. 215–234.
3. Aslam M. S., Ahmad M. S. Worldwide importance of medicinal plants: current and historical perspectives // *Recent Adv. Biol. Med.* 2016. V. 2. P. 88–93.
4. Калмыков С., Калмыкова Ю. Характеристика лекарственных растений, применяемых в фитотерапии сахарного диабета 2-го типа // Слобожанський науково-спортивний вісник. 2016. № 3(53). С. 53–58. [Kalmykov S., Kalmykova Ju. Harakteristika lekarstvennyh rastenij, primenjaemyh v fitoterapii saharного diabeta 2-go tipa // Slobozhans'kij naukovo-sportivnij visnik. [Kalmykov S., Kalmykova Yu. Description of medicinal plants used in phytotherapy of type 2 diabetes mellitus // Slobozhansky science and sports journal.] 2016. № 3(53). S. 53–58.]
5. Sheweita S. A. et al. Changes in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced Diabetes mellitus in rats: Role of *Alhagi maurorum* extracts // *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016. V. 2016. P. 8.
6. Lui T. N. et al. Activation of imidazoline I 2B receptors is linked with AMP kinase pathway to increase glucose uptake in cultured C 2 C 12 cells // *Neuroscience letters.* 2010. V. 474. № 3. P. 144–147.
7. Lupak M. I. et al. The alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract prevents oxidative stress under experimental diabetes mellitus // *Ukrainian biochemical journal.* 2015. V. 87. № 4. P. 78–86.

8. Останова Н. А., Пряхина Н. И. Некоторые фармакологические свойства надземной части *Galega officinalis* L. и *G. orientalis* Lam // Растительные ресурсы. 2003. Т. 39. № 4. С. 119–129. [Ostanova N. A., Prjahina N. I. nekotorye farmakologicheskie svojstva nadzemnoj chasti *Galega officinalis* L. i *G. orientalis* Lam // Rastitel'nye resursy. 2003. T. 39. № 4. S. 119–129.]
9. Якимова Т. В. и др. Гипогликемическое действие экстракта из *Galega officinalis* (Fabaceae), культивируемой на Алтае // Растительные ресурсы. 2005. Т. 41. № 2. С. 134–138. [Jakimova T. V. i dr. Gipoglikemicheskoe dejstvie jekstrakta iz *Galega officinalis* (Fabaceae), kul'tiviruemoj na Altae // Rastitel'nye resursy. 2005. T. 41. № 2. S. 134–138.]
10. Lui T. N. et al. Activation of imidazoline I2B receptors is linked with AMP kinase pathway to increase glucose uptake in cultured C2C12 cells // Neuroscience letters. – 2010. V. 474. № 3. P. 144–147.
11. Christensen K. B. et al. Identification of plant extracts with potential anti-diabetic properties: effect on human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake // Phytotherapy research. 2009. V. 23. № 9. P. 1316–1325.
12. Palit P., Furman B. L., Gray A. J. Novel weight reducing activity of *Galega officinalis* in mice // Journal of pharmacy and pharmacology. 1999. V. 51. № 11. P. 1313–1319.
13. Mooney M. H. et al. Mechanisms underlying the metabolic actions of galegine that contribute to weight loss in mice // British journal of pharmacology. 2008. V. 153. № 8. P. 1669–1677.
14. Coxon G. D. et al. Benzylguanidines and other galegine analogues inducing weight loss in mice // Journal of medicinal chemistry. 2009. V. 52. № 11. P. 3457–3463.
15. Плечищик Е. Д., Гончарова Л. В., Спиридович Е. В., Решетников В. Н. Пажитник греческий (*Trigonella foenum graecum* L.) как источник широкого спектра биологически активных соединений // Труды БГУ. 2010. Т. 4(2). С. 1–9. [Plechishhik E. D., Goncharova L. V., Spiridovich E. V., Reshetnikov V. N. Pazhitnik grecheskij (*Trigonella foenum graecum* L.) kak istochnik shirokogo spektra biologicheskij aktivnyh soedinenij // Trudy BGU. 2010. T. 4(2). S. 1–9.]
16. Растительные ресурсы России. Т. 4. Семейства *Caprifoliaceae* – *Lobeliaceae*. Под ред. А. Л. Буданцева, СПб.; Товарищество научных изданий КМК, 630 с. [Rastitel'nye resursy Rossii. T. 4. Semejstva *Caprifoliaceae* – *Lobeliaceae*. [Families *Caprifoliaceae* – *Lobeliaceae*.] Pod red. A. L. Budanceva, SPb.; Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK, 630 s.]
17. Barrett M. L., Udani J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control // Nutrition Journal. – 2011. V. 10. № 1. P. 24.
18. Spadafranca A. et al. *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects // British Journal of Nutrition. 2013. V. 109. № 10. P. 1789–1795.
19. Tan Y., Chang S. K. C., Zhang Y. Comparison of α-amylase, α-glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera // Food chemistry. 2017. V. 214. P. 259–268.
20. Mojica L., de Mejia E. G. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential // Food & function. 2016. V. 7. № 2. P. 713–727.
21. Lomas-Soria C. et al. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) modulate renal genes in streptozotocin-induced diabetic rats // The Journal of nutritional biochemistry. 2015. V. 26. № 7. P. 761–768.
22. Okada Y., Okada M., Sagesaka Y. Screening of dried plant seed extracts for adiponectin production activity and tumor necrosis factor-α inhibitory activity on 3T3-L1 adipocytes // Plant foods for human nutrition. 2010. V. 65. № 3. P. 225–232.
23. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Семейство *Asteraceae* (*Compositae*). Часть 1. Роды *Asteraceae* (*Compositae*). Часть 1. Роды *Achillea-Doronicum* / Под ред. Буданцева А. Л. – СПб.: Товарищество научных изданий КМК. 320 с. [Rastitel'nye resursy Rossii. Dikorastushhie cvetkovye rastenija, ih komponentnyj sostav i biologicheskaja aktivnost'. T. 5. Semejstvo *Asteraceae* (*Compositae*). Chast' 1. Rody *Achillea-Doronicum* / Pod red. Budanceva A. L. – SPb.: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK. 320 s.]
24. Hosseini M., Asgary S., Najafi S. Inhibitory potential of pure isoflavonoids, red clover, and alfalfa extracts on hemoglobin glycosylation // ARYA atherosclerosis. 2015. V. 11. № 2. P. 133.
25. Растительные ресурсы России. Т. 3. Семейства *Fabaceae* – *Apiaceae* / Под ред. Буданцева А. Л., – СПб.: Товарищество научных изданий КМК. 604 с. [Rastitel'nye resursy Rossii. T. 3. Semejstva *Fabaceae* – *Apiaceae* / Pod red. Budanceva A. L. – SPb.: Tovarishhestvo nauchnyh izdanij KMK. 604 s.]
26. Mahato S. B., Garai S. Triterpenoid saponins // Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. – Vienna: Springer, 1998. P. 1–196.
27. Dushkin et al. Effects of rhaponticum carthamoides versus glycyrrhiza glabra and punica granatum extracts on metabolic syndrome signs in rats // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2014. V. 14. P. 33.
28. Baghernya M., Nobili V., Blesso C. N., Sahhebkar A. Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a clinical review // Pharmacological Research. 2017.
29. Ya-Ling Liu, Lei-Chen Lin, Yu-Tang Tung, Shang-Tse Ho, Yao-Li Chen, Chi-Chen Lin, Jyh-Horng Wu. Rhododendron oldhamii leaf extract improves fatty liver syndrome by increasing lipid oxidation and decreasing the lipogenesis pathway in mice // International Journal of Medical Sciences. 2017. V. 14(9). P. 862–870.
30. Li N. Y., Li X. L., Zhai X. P., Wang Q. Y., Zhang X. W., Zhao F., Wang X. F., Fan J. Y., Bai F., Yu J. Effects of Mongolia Astragali Radix in protecting early cardiac and nephritic functions of patients of hypertension with metabolic syndrome // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2016. V. 41(21). P. 4051–4059.
31. Chiva-Blanch G., Badimon L. Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. V. 2017. 18 p.
32. Giampieri F., Forbes-Hernandez T. Y., Gasparini M., Afrin S., Cianciosi D., Reboredo-Rodriguez P., Varela-Lopez A., Quiles J. L., Mezzetti B., Battino M. The healthy effects of strawberry bioactive compounds on molecular pathways related to chronic diseases // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2017. V. 1398(1). P. 62–71.
33. Ayoub H. M., McDonald M. R., Sullivan J. A., Tsao R., Platt M., Simpson J., Meckling K. A. The Effect of Anthocyanin-Rich Purple Vegetable Diets on Metabolic Syndrome in Obese Zucker Rats // J Med Food. 2017. P. 1–10.
34. Bhaswant M., Shafie S. R., Mathai M. L., Mouatt P., Brown L. Anthocyanins in chokeberry and purple maize attenuate diet-induced metabolic syndrome in rats // Nutrition. 2017. V. 9. P. 1261.
35. Chavushyan V. A., Simonyan K. V., Simonyan R. M., Isoyan A. S., Simonyan G. M., Babakhanyan M. A., Hovhannisyian L. E., Nahapetyan Kh. H., Avetisyan L. G., Simonyan M. A. Effects of stevia on synaptic plasticity and NADPH oxidase level of CNS in conditions of metabolic disorders caused by fructose // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2017. V. 17. P. 540.
36. Carrera-Lanestosa A., Moguel-Ordoñez Y., Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome // J Med Food. 2017. P. 1–11.

УДК 615.076; 615.272; 615.015.12

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИНСУЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ РЯДА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И ЕГО АНАЛОГОВ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

И. Н. Уракова^{1*}, К. Л. Крышень², О. Н. Пожарицкая¹, М. В. Гаврилин^{3**},
А. Н. Шиков¹, М. Н. Макарова², В. Г. Макаров²

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимодействия субстанций инсулина отечественного производства, в том числе короткого и длительного действия, с инсулиновым рецептором в сравнении с субстанциями зарегистрированных препаратов методом поверхностного плазмонного резонанса. При сравнении характера кривых кинетики взаимодействия и рассчитанных равновесных констант диссоциации, определенных методом поверхностного плазмонного резонанса, статистически значимые различия между потенциально биоаналогичными субстанциями инсулина Росинсулин Р[®], Росинсулин гларгин[®] и Росинсулин аспарт[®] (ООО «Завод Медсинтез») и соответствующими им субстанциями, входящими в состав зарегистрированных лекарственных препаратов, отсутствуют.

Ключевые слова: инсулин, инсулин гларгин, инсулин аспарт, инсулиновый рецептор, плазмонный резонанс, константа ассоциации.

COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION OF SOME DOMESTIC HUMAN INSULIN SUBSTANCES AND ITS ANALOGUES WITH INSULIN RECEPTOR BY METHOD OF SURFACE PLASMON RESONANCE

I. N. Urakova^{1*}, K. L. Kryshen², O. N. Pozharitskaya¹, M. V. Gavrilin^{3**}, A. N. Shikov¹, M. N. Makarova², V. G. Makarov²

Abstract. The high demand for insulin preparations by the population of the country makes it urgent to create domestic bioanalogues for the treatment of diabetes mellitus. The equivalency of the quality, safety and efficacy of the bioanalogue with the reference medicinal preparation registered in Russia is required by authority at the stage of preclinical studies. The aim of the study was to study the interaction of insulin substances of domestic production, including short and long-acting insulin with the insulin receptor in comparison with the reference substances registered in Russia by the surface plasmon resonance method. Comparing the interaction kinetics curves and calculated dissociation constants determined by the surface plasmon resonance method it was confirmed that there are no statistically significant differences between the potentially bioanalogical insulin substances Rosinsulin R, Rosinsulin Glargin and Rosinsulin Aspart (LLC "Zavod Medsintez", Russia) and the corresponding substances of registered in Russia medicines.

Keywords: insululin, insululin glargin, insulin aspart, insulin receptors, plasmon resonance, association constant. insululin, insululin glargin, insulin aspart, insulin receptors, plasmon resonance, association constant.

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

2 – АО «НПО «Дом Фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

3 – ООО «Завод Медсинтез», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8-е Марта, д. 90а

1 – St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – RMC «HOUSE OF PHARMACY» JSC, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – LLC «Zavod Medsintez», 90a, 8 Marta str., Ekaterinburg, 620014, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: info@doclinika.ru

Тел.: 8 (812) 603 24 32

** адресат для переписки:

E-mail: farmnauka@mail.ru

Тел.: 8 (34370) 250 61

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день биотехнологические лекарственные препараты занимают от 10 до 20% мирового фармацевтического рынка. При этом большая часть из них производится зарубежными компаниями [1]. Оригинальные био-

технологические препараты чаще всего разрабатываются на основе аналогов эндогенных человеческих белков (инсулин, эритропоэтин, гормон роста и т.д.) с применением технологий синтеза рекомбинантной ДНК или методами генной инженерии [2]. Вследствие этого разработка оригинальных биотехнологических препаратов

характеризуется не только высокой наукоемкостью и существенной длительностью процесса, но и большими затратами, что находит отражение в их высокой стоимости. Возможным выходом для пациентов в сложившейся ситуации может быть использование биоаналогов, эффективность и безопасность которых соответствует оригинальным препаратам [3, 4].

Биоаналогичный (биоподобный) лекарственный препарат – это биологический лекарственный препарат, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим лекарственным препаратом в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения [5].

Высокие доказательные результаты, отражающие сходство физико-химических и биологических свойств биоаналогичного препарата, позволяют уменьшить объем клинических и доклинических исследований [3]. В случае подтверждения идентичности механизма действия биоаналога по сравнению с референтным препаратом есть вероятность экстраполировать применение биоаналогичного препарата по всем показателям, описанным для референтного [6]. Таким образом, применяя поэтапный подход для доказательства биоаналогичности, можно уменьшать количество и стоимость исследований последующего этапа.

Высокая востребованность населением страны препаратов инсулина делает актуальным создание отечественных биоаналогов для лечения сахарного диабета. В Российской Федерации зарегистрированы и применяются генно-инженерные препараты человеческого инсулина различных производителей [7]. Отечественные производители пока не являются лидирующими в этом списке, но активно работают над поставленной задачей по импортозамещению.

Для подтверждения биоаналогичности генно-инженерных препаратов человеческого инсулина и аналогов инсулина человека необходимо доказать, что они по своему качеству, фармакокинетическому и фармакодинамическому профилям, безопасности и иммуногенности не отличаются от референтного препарата [8, 9]. На начальных этапах исследования должны быть изучены и подтверждены сходства физико-химических и биологических свойств препаратов инсулина и аналогов инсулина человека.

В рамках доклинических исследований биологической активности *in vitro* необходимо провести сравнительные исследования по связыванию с рецепторами [9] с использованием современных высокочувствительных методов. Одним из методов, рекомендованных руководством [9] для проведения сравнительного исследования связывания с рецепторами, является поверхностный плазмонный резонанс.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) используется в биохимии более трех десятилетий. Образование межмолекулярных комплексов на границе

раздела двух сред сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что приводит к модуляции параметров ППР, регистрируемой детектором [10]. Фактически ППР-детекторы являются рефрактометрами. Методы, основанные на ППР, привлекают исследователей прежде всего возможностью регистрации взаимодействий без использования меток, высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов. Процессы массопереноса между средой и сенсорной поверхностью в ходе образования и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависимости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования.

Технология ППР-детекции носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия как низкомолекулярных объектов, так и макромолекул, их агрегатов, вирусов и даже целых клеток. Это обусловило интенсивное применение метода в фундаментальных исследованиях, медицине, экологическом мониторинге, контроле безопасности пищевых продуктов и других областях [11, 12]. В последнее время значительные усилия направлены на совершенствование ППР-техники – увеличение чувствительности детекции [13] и создание систем для одновременной регистрации многих взаимодействий [14].

Целью настоящего исследования являлось изучение взаимодействия субстанций инсулина с различной направленностью действия с инсулиновым рецептором [определение кинетических параметров связывания: констант ассоциации, констант диссоциации, равновесной константы диссоциации (K_a , K_d , K_D)] в сравнении с субстанциями зарегистрированных препаратов методом поверхностного плазмонного резонанса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемых субстанций были взяты субстанции, произведенные на ООО «Завод Медсинтез», Россия:

Росинсулин P® (серия 011016P, срок годности 10.2019); Росинсулин аспарт P® (серия A040516, срок годности 05.2019) – аналог инсулина короткого действия; Росинсулин гларгин® (серия G011216, срок годности 12.2019) – аналог инсулина длительного действия.

Субстанции сравнения были выделены на ООО «Завод Медсинтез», Россия, из соответствующих референтных препаратов:

Хумулин® Регуляр (серия 010217XP, срок годности 02.2020; «Эли Лилли энд Компани», США);

НовоРапид® Пенфилл® (серия NN010217, срок годности 02.2020; «Эли Лилли энд Компани», США) – аналог инсулина короткого действия;

Лантус® СолоСтар® (серия ЛСС010217, срок годности 02.2020; «Санofi-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия) – аналог инсулина длительного действия.

Оборудование

Измерения проводили на приборе SPR ProteOn XPR36™ (Bio-Rad Laboratories, США) с чипами к биосенсору GLM (Bio-Rad Laboratories, США).

Метод

Метод поверхностного плазмонного резонанса включает в себя иммобилизацию одного из партнеров по взаимодействию (лиганда) на полимерном слое поверхности чипа биосенсора с последующим взаимодействием с другим партнером по взаимодействию (аналитом), проходящим над лигандом. В данном случае лиганд представляет собой конструкцию, содержащую аминокислотную цепочку, связанную с поверхностью чипа моноклональным антителом, и захваченный впоследствии рецептор eIR.

На пересечении канала аналита с каналом лиганда находится «пятно» взаимодействия, в котором происходит регистрация отклика поверхностного плазмонного резонанса во времени, что отражается на сенсограмме.

В качестве рабочего буфера использовали фосфатно-солевой раствор (137 мМ натрия хлорида, 2,7 мМ калия хлорида, 10 мМ двухосновного фосфата натрия и 2 мМ одноосновного фосфата калия), содержащий 0,005% (об./об.) твин-20 при pH 7,4, что соответствует физиологическим условиям взаимодействия инсулина и рецептора во время анализа. Температура образцов и чипа составляла 25 °C в течение всего эксперимента.

При изучении взаимодействия инсулина и рецептора растворы инсулина в концентрациях 156–2500 нМ пропускали одновременно в направлении каналов аналита при скорости потока 25 мкл/мин в течение 300 с для ассоциации. Диссоциацию изучали в течение 650 с. Перед повторной инъекцией аналита поверхность чипа регенерировалась путем пропускания раствора глицина гидрохлорида с pH 2,0 по каналам лигандов в течение 20 с (скорость потока – 25 мкл/мин) для снятия инсулина и рецептора с антител. Эксперимент повторяли 3 раза.

Полученные данные обрабатывали при помощи программы ProteOn Manager™ software (Bio-Rad, США): константы ассоциации (k_a), диссоциации (k_d) и равновесные константы диссоциации (K_D) были рассчитаны с применением модели анализа «two states». Степень различия между экспериментальными и теоретическими кривыми оценивают с помощью критерия хи-квадрат (χ^2). Достоверность сходства экспериментальных кривых с теоретическими при уровне значимости $p < 0,05$ определяли путем сравнения полученных значений χ^2 с табличными.

Различия между K_D для исследуемой субстанции и соответствующей по продолжительности действия субстанции сравнения определяли в t-тесте Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$ с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инсулиновый рецептор представляет собой мембранный белок, принадлежащий к классу трансмембранных рецепторов с тирозинкиназной активностью (RTK) [15]. Белок состоит из двух α - и двух β -субъединиц. А-субъединицы связывают инсулин, тогда как С-концевая область β -субъединиц имеет тирозинкиназную каталитическую область, которая опосредует фосфорилирование тирозина [16]. Каждый инсулиновый рецептор (IR) имеет два сайта связывания для инсулина: один связывает инсулин с высокой аффинностью, второй – с низкой аффинностью. При более высоких концентрациях количество инсулина, связанного с рецептором, увеличивается, но в среднем аффинность уменьшается. Это явление упоминается как «отрицательная кооперативность» [17].

Инсулин в поджелудочной железе обычно присутствует в виде гексамера, который стабилизируется Zn^{2+} , но связывается с рецептором в виде мономера, не содержащего Zn^{2+} [18]. Инсулин имеет два участка, участвующих в связывании инсулиновым рецептором. Инсулиновые остатки, ответственные за димеризацию и гексамеризацию (олигомеризация инсулина) соответственно образуют два сайта, которые связывают рецептор [19]. В процессе связывания как инсулин, так и IR подвергаются конформационным изменениям [20], что приводит к иницированию сигнального каскада для поглощения глюкозы.

Ранние исследования 1970-х годов были посвящены связыванию инсулина с клеточными мембранами и сфокусированы на простом бимолекулярном взаимодействии: модель связывания с одним сайтом. В 80-х годах была предложена модель связывания двух сайтов, чему были получены значительные доказательства. Широко распространенная модель, принятая в настоящее время, основывается на гипотезах Шеффера (Schäffer) [20] и Де Мейтса и Виттакера (De Meyts and Whittaker's) [21].

Согласно модели Шеффера инсулин первоначально взаимодействует с двумя мономерами IR путем объединения с сайтами 1 и 2' (рисунок 1).

Эта модель дала объяснение возможности связывания второй молекулы инсулина с сайтом 2 и третьей – с сайтом 1'. Однако эта модель не дала убедительного объяснения явлению отрицательной кооперативности. Эта проблема была преодолена Де Мейтсом и Виттакером [21] благодаря их альтернативной теории высокоаффинного взаимодействия



Рисунок 1. Возможные сайты для связывания инсулина на инсулиновом рецепторе: 1, 2, 1' и 2' (сайты 1 и 2 – от одного мономера, а 1' и 2' – от другого)

между участками 1 и 2' в одном положении, вызывающего конформационные изменения, влияющие на соответствующие участки 1' и 2, где вторая молекула инсулина может связываться с более низким средством.

Современная модель связывания инсулина состоит в том, что каждая цепь в IR-димере содержит два инсулинсвязывающих кармана: участки 1 и 2 на одной цепи и участки 1' и 2' на другой. Связывание инсулина с одним из карманов описывается как «низкоаффинное связывание», тогда как сшивка участков 1 и 2' или 2 и 1' одной молекулой инсулина ответственна за «высокоаффинное связывание» [22–23]. В связи с этим для изучения кинетики взаимодействия инсулина и рецептора была выбрана модель «two state».

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА P® И ИНСУЛИНА ХУМУЛИН® РЕГУЛЯР

На рисунках 2 и 3 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр с рецептором.

Характер взаимодействия субстанций с рецептором одинаков (рисунки 2 и 3): обе субстанции демонстрируют быструю ассоциацию с достижением равновесия уже в течение первых 20–30 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро. При диссоциации ответ (RU) полностью не возвращается к исходному уровню.

В таблицах 1 и 2 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр с рецептором.

Средние значения равновесных констант диссоциации для Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр составляют: $K_D = (5,79 \pm 1,31) \times 10^{-7}$ М и $K_D = (4,37 \pm 0,41) \times 10^{-7}$ М соответственно. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.

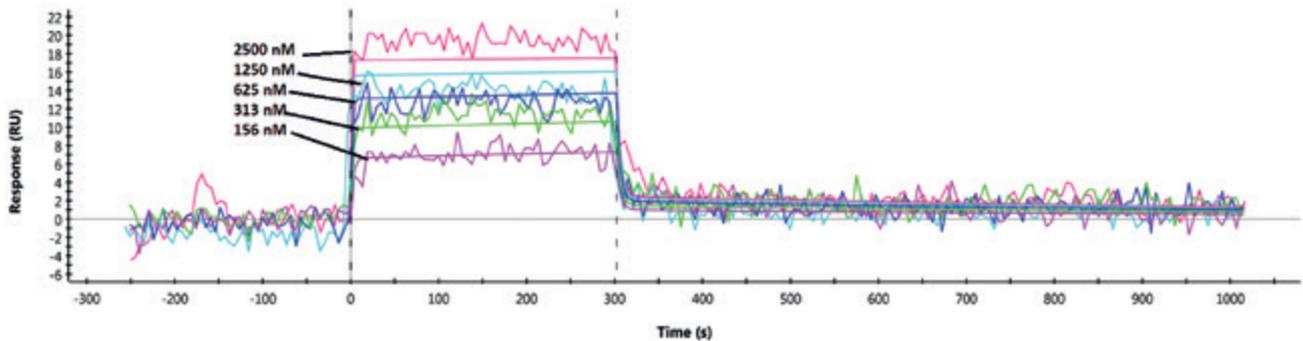


Рисунок 2. Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина P® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

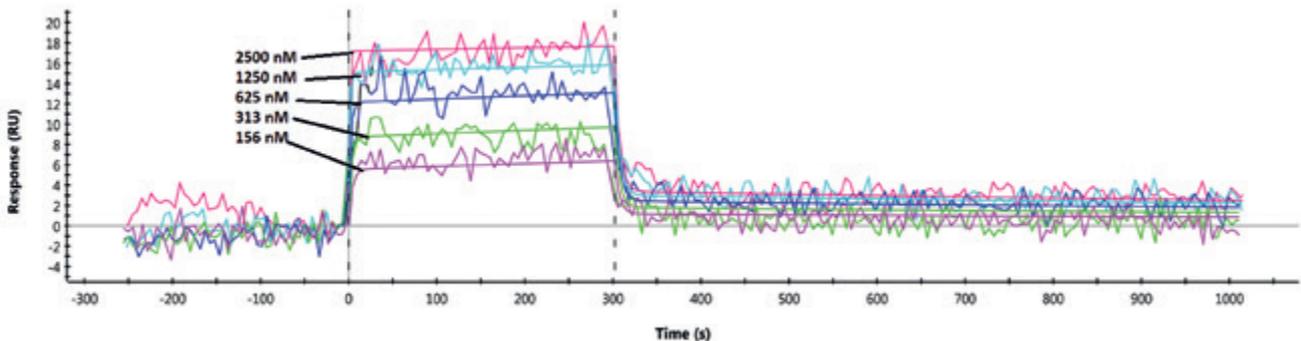


Рисунок 3. Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина Хумулин® Регуляр (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

Таблица 1.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина P® с рецептором

Константа ассоциации 1, K_{a1} , 1/Ms	Константа диссоциации 1, K_{d1} , 1/s	Равновесная константа диссоциации, K_D , M	Константа ассоциации 2, K_{a2} , 1/Ms	Константа диссоциации 2, K_{d2} , 1/s	χ^2
$8,03 \times 10^5$	$2,39 \times 10^{-1}$	$2,97 \times 10^{-7}$	$5,80 \times 10^{-4}$	$9,11 \times 10^{-4}$	1,75
$6,06 \times 10^5$	$2,51 \times 10^{-1}$	$4,14 \times 10^{-7}$	$5,62 \times 10^{-4}$	$5,92 \times 10^{-4}$	1,73
$2,81 \times 10^5$	$2,22 \times 10^{-1}$	$7,87 \times 10^{-7}$	$1,33 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	2,33
$3,12 \times 10^5$	$2,55 \times 10^{-1}$	$8,18 \times 10^{-7}$	$1,56 \times 10^{-3}$	$8,34 \times 10^{-4}$	3,42

Таблица 2.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия инсулина Хумулин® Регуляр с рецептором

Константа ассоциации 1, K_{a1} , 1/Ms	Константа диссоциации 1, K_{d1} , 1/s	Равновесная константа диссоциации, K_D , M	Константа ассоциации 2, K_{a2} , 1/Ms	Константа диссоциации 2, K_{d2} , 1/s	χ^2
$4,47 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-1}$	$4,30 \times 10^{-7}$	$7,53 \times 10^{-4}$	$4,27 \times 10^{-4}$	1,29
$1,25 \times 10^6$	$4,09 \times 10^{-1}$	$3,27 \times 10^{-7}$	$5,11 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^{-2}$	1,61
$1,41 \times 10^5$	$7,16 \times 10^{-1}$	$5,09 \times 10^{-7}$	$6,84 \times 10^{-3}$	$1,87 \times 10^{-2}$	1,46
$1,38 \times 10^6$	$6,70 \times 10^{-1}$	$4,85 \times 10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-2}$	$2,51 \times 10^{-2}$	1,08

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА АСПАРТ P® И ИНСУЛИНА НОВОРАПИД® ПЕНФИЛЛ®

На рисунках 4 и 5 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина аспарт P® и инсулина НовоРапид® Пенфилл® с рецептором.

При взаимодействии данных субстанций с рецептором наблюдалась быстрая фаза ассоциации. Равновесие достигалось уже через 20 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро, без полного возвращения ответа (RU) к исходному уровню (рисунки 4 и 5).

В таблицах 3 и 4 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина аспарт P® и инсулина НовоРапид® Пенфилл® с рецептором.

Согласно результатам, полученным по модели «two states», субстанция Росинсулин аспарт P® характеризовалась значением K_D $(4,10 \pm 0,50) \times 10^{-7}$ M. Субстанция инсулин НовоРапид® Пенфилл® характеризовалась значением K_D $(4,57 \pm 0,17) \times 10^{-7}$ M. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.

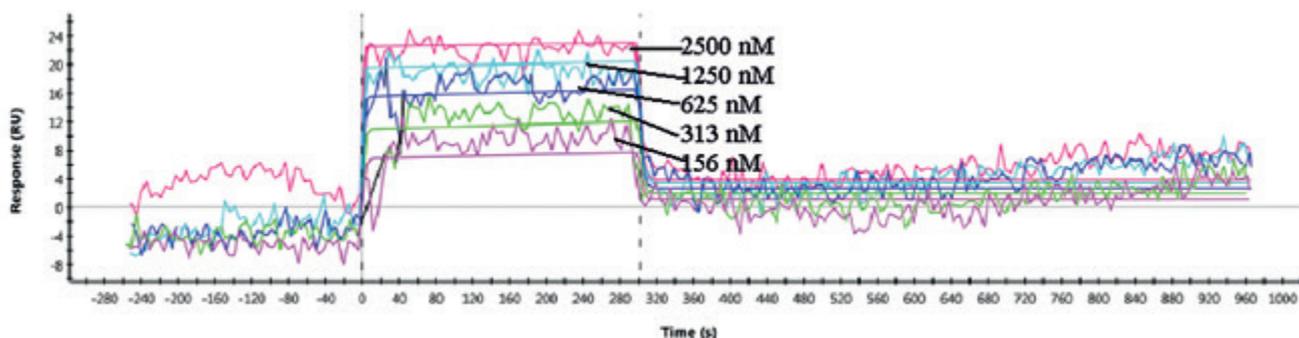


Рисунок 4. Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина аспарт P® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

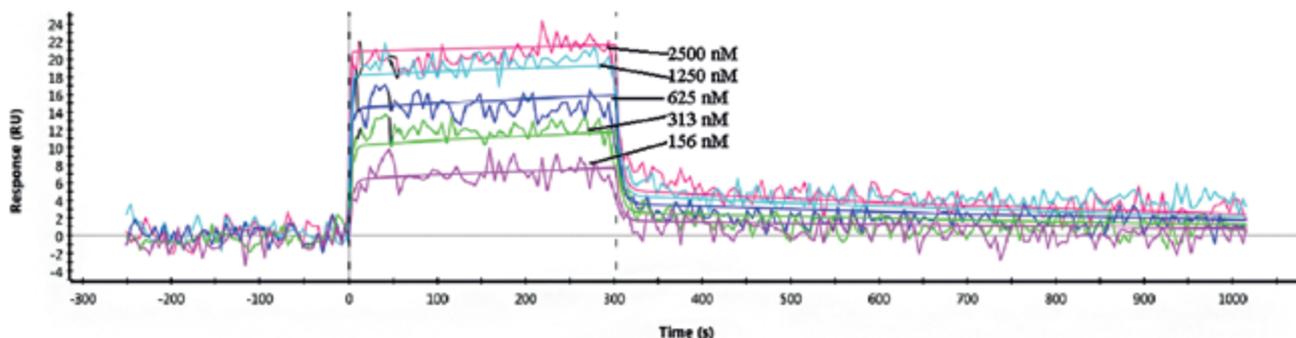


Рисунок 5. Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина НовоРапид® Пенфилл® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

Таблица 3.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина аспарт Р® с рецептором

Константа ассоциации 1, K_{a1} , 1/Ms	Константа диссоциации 1, K_{d1} , 1/s	Равновесная константа диссоциации, K_D , M	Константа ассоциации 2, K_{a2} , 1/Ms	Константа диссоциации 2, K_{d2} , 1/s	χ^2
$7,30 \times 10^5$	$3,05 \times 10^{-1}$	$4,18 \times 10^{-7}$	$2,07 \times 10^{-14}$	$1,75 \times 10^{-5}$	5,12
$3,37 \times 10^5$	$1,70 \times 10^{-1}$	$5,04 \times 10^{-7}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$7,35 \times 10^{-4}$	8,61
$7,49 \times 10^5$	$3,35 \times 10^{-1}$	$4,48 \times 10^{-7}$	$6,14 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-14}$	5,65
$2,93 \times 10^5$	$7,89 \times 10^{-2}$	$2,69 \times 10^{-7}$	$2,34 \times 10^{-4}$	1,57	6,96

Таблица 4.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия инсулина НовоРapid® Пенфилл® с рецептором

Константа ассоциации 1, K_{a1} , 1/Ms	Константа диссоциации 1, K_{d1} , 1/s	Равновесная константа диссоциации, K_D , M	Константа ассоциации 2, K_{a2} , 1/Ms	Константа диссоциации 2, K_{d2} , 1/s	χ^2
$4,58 \times 10^5$	$1,99 \times 10^{-1}$	$4,34 \times 10^{-7}$	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$	1,89
$1,20 \times 10^6$	$5,76 \times 10^{-1}$	$4,79 \times 10^{-7}$	$2,42 \times 10^{-2}$	$3,52 \times 10^{-2}$	4,55
$4,15 \times 10^5$	$1,75 \times 10^{-1}$	$4,22 \times 10^{-7}$	$5,55 \times 10^{-4}$	$6,41 \times 10^{-4}$	1,87
$8,78 \times 10^4$	$4,33 \times 10^{-2}$	$4,93 \times 10^{-7}$	$8,54 \times 10^{-4}$	$4,34 \times 10^{-4}$	2,88

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА ГЛАРГИН® И ИНСУЛИНА ЛАНТУС® СОЛОСТАР®

На рисунках 6 и 7 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором.

Взаимодействие Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором демонстрирует быструю ассоциацию с достижением равновесия уже в течение первых 20 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро. В отличие от инсулина Лантус® СолоСтар® в случае Росинсулина гларгин® при диссоциации ответ (RU) полностью не возвращается к исходному уровню (рисунки 6 и 7).

В таблицах 5 и 6 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором.

Согласно полученным результатам субстанция Росинсулин гларгин® характеризовалась значением K_D $(12,63 \pm 2,76) \times 10^{-7}$ M. Субстанция инсулин

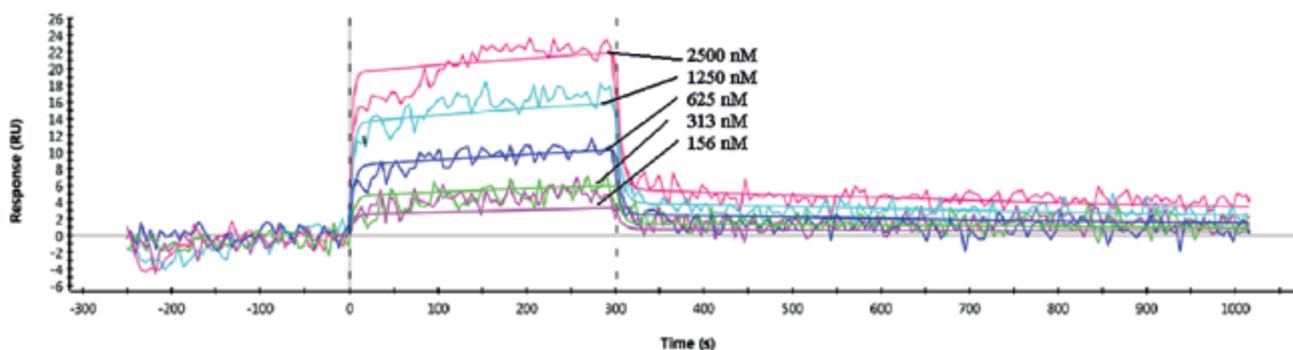


Рисунок 6. Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина гларгин® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

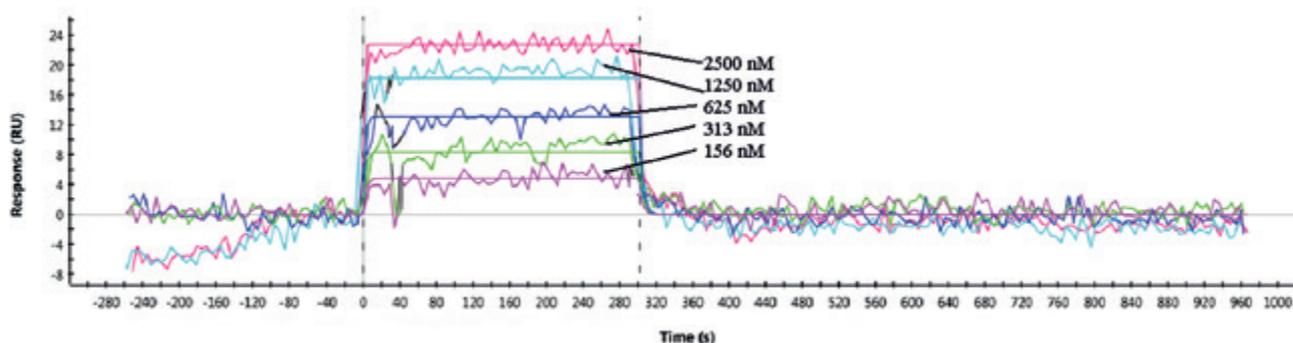


Рисунок 7. Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина Лантус® СолоСтар® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

Лантус® СолоСтар® характеризовалась значением $K_D (13,23 \pm 2,22) \times 10^{-7}$ М. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.

Таблица 5.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина гларгин® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}, 1/Ms$	Константа диссоциации 1, $K_{d1}, 1/s$	Равновесная константа диссоциации, K_D, M	Константа ассоциации 2, $K_{a2}, 1/Ms$	Константа диссоциации 2, $K_{d2}, 1/s$	χ^2
$9,20 \times 10^4$	$1,79 \times 10^{-1}$	$19,5 \times 10^{-7}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$6,89 \times 10^{-4}$	1,72
$1,40 \times 10^5$	$1,87 \times 10^{-1}$	$13,4 \times 10^{-7}$	$6,31 \times 10^{-4}$	$1,37 \times 10^{-3}$	1,93
$1,22 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{-1}$	$11,5 \times 10^{-7}$	$3,82 \times 10^{-4}$	$1,58 \times 10^{-3}$	4,72
$2,82 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-1}$	$6,10 \times 10^{-7}$	$3,27 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-11}$	1,90

Таблица 6.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}, 1/Ms$	Константа диссоциации 1, $K_{d1}, 1/s$	Равновесная константа диссоциации, K_D, M	Константа ассоциации 2, $K_{a2}, 1/Ms$	Константа диссоциации 2, $K_{d2}, 1/s$	χ^2
$4,84 \times 10^5$	$6,81 \times 10^{-1}$	$14,10 \times 10^{-7}$	$1,57 \times 10^{-2}$	$3,58 \times 10^{-2}$	1,83
$2,03 \times 10^5$	$2,39 \times 10^{-1}$	$11,80 \times 10^{-7}$	$5,25 \times 10^{-4}$	$2,55 \times 10^{-3}$	2,25
$3,70 \times 10^5$	$3,04 \times 10^{-1}$	$8,21 \times 10^{-7}$	$3,22 \times 10^{-15}$	$1,16 \times 10^{-5}$	2,22
$9,03 \times 10^5$	1,70	$18,88 \times 10^{-7}$	$9,58 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-2}$	3,81

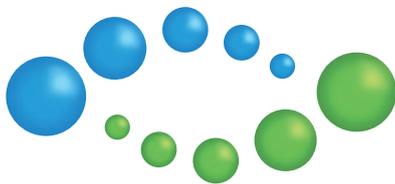
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые была проведена работа по оценке кинетики взаимодействия инсулина с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с целью подтверждения биоаналогичности новых субстанций существующим на рынке. По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что при сравнении характера кривых кинетики взаимодействия и рассчитанных равновесных констант диссоциации, определенных методом поверхностного плазмонного резонанса, статистически значимые различия между потенциально биоаналогичными субстанциями инсулина и соответствующими им по времени воздействия субстанциями, входящими в состав зарегистрированных лекарственных препаратов, отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

- Хабриев Р. У., Камаев Н. О., Данилова Т. И., Кахоян Е. Г. Биофармацевтические препараты и особенности контроля их качества // Вестник Росздравнадзора. 2015. № 6. С. 55–59. [Khabriev R. U., Kamaev N. O., Danilova T. I., Kakhoyan E. G. Biopharmatsevticheskie preparaty i osobennosti kontrolya ikh kachestva // Vestnik Roszdravnadzora. [Biopharmaceuticals and the features of monitoring their quality // Bulletin of Roszdravnadzor]. 2015. № 6. С. 55–59].
- Проценко М. В., Ягудина Р. И. Биотехнологические лекарственные средства и биоподобные препараты: обзор практического применения и нормативной базы регулирования обращения // Фармакоэкономика. 2010. Т. 3. № 4. С. 13–21. [Protsenko M. V., Yagudina R. I. Biotekhnologicheskie lekarstvennyye sredstva i biopodobnyye preparaty: obzor prakticheskogo primeneniya i normativnoi bazy regulirovaniya obrashcheniya // Farmakoeconomika. [Biotechnological medicinal products and biolike preparations: a review of practical application and regulatory framework of treatment regulation // Pharmacoeconomics]. 2010. Т. 3. № 4. С. 13–21].
- Орлов С. В., Шимановский Н. Л., Фогт С. Н. Возможно ли использование биоаналога бевацизумаба при всех показаниях, зарегистрированных для оригинального препарата? // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3. № 2. С. 45–52. [Orlov S. V., Shimanovskii N. L., Fogt S. N. Vozmozhno li ispol'zovanie bioanaloga bevatsizumaba pri vseh pokazaniyakh, zaregistrirrovannykh dlya original'nogo preparata? // Issledovaniya i praktika v meditsine. [Is it possible to use the bioavailable bevacizumab for all indications recorded for the original drug? // Research and practice in medicine]. 2016. Т. 3. № 2. С. 45–52].
- Маргаева Б. Ю. Подходы к оценке взаимозаменяемости биоаналогов (биосимиляров) на стадии их государственной регистрации в свете реализации стратегии «Фарма-2020» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 88–94. [Margaeva B. Yu. Podkhody k otsenke vzaimozamenyaemosti bioanalogov (biosimilyarov) na stadii ikh gosudarstvennoi registratsii v svete realizatsii strategii «Farma-2020» // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Approaches to the assessment of the interchangeability of bioanalogs (biosimilars) at the stage of their state registration in the light of the implementation of the "Pharma-2020" strategy // Development and registration of medicines]. 2013. № 3(4). С. 88–94].
- Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 28.12.2017) «Об обращении лекарственных средств».
- Солдатов А. А., Авдеева Ж. И., Алпатова Н. А., Медуницын Н. В., Мосягин В. Д., Гайдерова Л. А., Яковлев А. К., Бондарев В. П., Миронов А. Н. Доказательство подобия рекомбинантных эпоэтинов, зарегистрированных на основе принципов «biosimilars» (физико-химические и биологические свойства) // Биопрепараты. 2014. Т. 1. № 49. С. 11–22. [Soldatov A. A., Avdeeva Zh. I., Alpatova N. A., Medunitsyn N. V., Mosyagin V. D., Gaiderova L. A., Yakovlev A. K., Bondarev V. P., Mironov A. N. Dokazatel'stvo podobiya rekombinantnykh epoetinov, zaregistrirrovannykh na osnove printsiptov «biosimilars» (fiziko-khimicheskie i biologicheskie svoistva) // Biopreparaty. [Proof of the similarity of recombinant epoetins registered on the basis of the principles of "biosimilars" (physico-chemical and biological properties) // Biopreparations]. 2014. Т. 1. № 49. С. 11–22].
- Проскурина И. А., Майоров А. Ю., Горячев Д. В., Бунятян Н. Д. Современные подходы к оценке фармакокинетики и фармакодинамики биоподобных генно-инженерных препаратов человеческого инсулина и аналогов инсулина человека в рамках I фазы клинического исследования // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. № 3. С. 251–259. [Proskurina I. A., Maiorov A. Yu., Goryachev D. V., Bunyatyan N. D. Sovremennyye podkhody k otsenke farmakokinetiki i farmakodinamiki biopodobnykh genno-inzhenernykh preparatov chelovecheskogo insulina i analogov insulina cheloveka v ramkakh I fazy klinicheskogo

- issledovaniya // Sakharnyi diabet. [Modern approaches to the evaluation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of biosimilar genetically engineered preparations of human insulin and human insulin analogues within the framework of the Phase I clinical trial. // Diabetes mellitus]. 2016. T. 19. № 3. S. 251–259].
8. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1). URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184161.pdf (дата обращения 02.08.2018).
 9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. – М.: Полиграф-Плюс. 2014. С. 54.
 10. Schasfoort R. B. M., Tudos A. J. Handbook of Surface Plasmon Resonance. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2008. 403 p.
 11. Иванов А. С., Медведев А. Е. Оптический плазмонно-резонансный биосенсор в молекулярном фишинге // Биомедицинская химия. 2015. V. 61. С. 231–238. [Ivanov A. S., Medvedev A. E. Opticheskiy plazmonno-rezonansnyi biosensor v molekulyarnom fishinge // Biomeditsinskaya khimiya. [Optical plasmon resonance biosensor in molecular phishing // Biomedical chemistry]. 2015. V. 61. С. 231–238].
 12. Mariani S., Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014. V. 406. С. 2303–2323.
 13. Shalabney A., Abdulhalim I. Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors // Lasers and Photonics Reviews. 2011. V. 5. С. 571–606.
 14. Situ C., Buijs J., Mooney M. H., Elliott C. T. Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2010. V. 29. С. 1305–1315.
 15. Soll R., Beck-Sickingler A. On the role of neuropeptides in the hypothalamic regulation of food intake // Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents. 2001. V. 1(2). P. 151–169.
 16. Czech M. P. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function // Annu Rev Physiol. 1985. V. 47. P. 357–81.
 17. Shanik M., Xu Y., Škrha J., Dankner R., Zick Y., Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia // Diabetes Care. 2008. V. 31. Suppl. 2. P. 262.
 18. Nakagawa S. H., Tager H. S., Steiner D. F. Mutational Analysis of Invariant Valine B12 in Insulin: Implications for Receptor Binding // Biochemistry. 2000. V. 39 (51). P. 15826–15835.
 19. Menting J. G., Whittaker J., Margetts M. B., Whittaker L. J., Kong GK-W., Smith B. J., Watson C. J., Žáková L., Kletvíková E., Jiráček J. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor // Nature. 2013. V. 493 (7431). P. 241–245.
 20. Schäffer L. A model for insulin binding to the insulin receptor // Eur. J. Biochem. 1994. V. 221(3). P. 1127–1132.
 21. De Meyts P., Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design // Nature Reviews Drug Discovery. 2002. V. 1(10). P. 769–783.
 22. Lawrence M. C., McKern N. M., Ward C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor // Current Opinion in Structural Biology. 2007. V. 17(6). P. 699–705.
 23. Ward C. W., Lawrence M. C., Streltsov V. A., Adams T. E., McKern N. M. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation // Trends in Biochemical Sciences. 2007. V. 32(3). P. 129–137.



КОНГРЕССНО- ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПОФОРУМ

БИОИНДУСТРИЯ

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНКУРС ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ



Выставка-конкурс
проходит в рамках
Петербургского
международного
форума здоровья

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

1 **БИОТЕХНОЛОГИИ
В СФЕРЕ ИНДУСТРИИ
ЗДОРОВЬЯ**

3 **БИОТЕХНОЛОГИИ
В СФЕРЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ
БЕЗОПАСНОСТИ**

2 **СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ
И ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ**

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

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА

- КОНКУРС
ИННОВАЦИОННЫХ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
РЕШЕНИЙ

- КОНФЕРЕНЦИЯ-ПРЕЗЕНТАЦИЯ
ИННОВАЦИОННЫХ РАЗРАБОТОК
«БИОИНДУСТРИЯ НА ПУТИ
К ТЕХНОЛОГИЯМ БУДУЩЕГО»

12+

ОРГАНИЗАТОР
EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ
МЕДИАПАРТНЕР
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СПОНСОР
ГАЗПРОМБАНК

ПЕТЕРБУРГСКОЕ ШОССЕ, 64/1
тел.: +7 812 240 40 40, доб. 2292

BIO@EXPOFORUM.RU
AA.BELOUSOVA@EXPOFORUM.RU
WWW.BIO.EXPOFORUM.RU



УДК 574.24; 615.322

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО, СОБРАННОГО В ЦЕНТРАЛЬНОМ ЧЕРНОЗЕМЬЕ

Н. А. Дьякова^{1*}

Резюме. Изучено накопление естественных и искусственных радионуклидов, а также биологически активных веществ в листьях подорожника большого, собранного на территории Воронежской области в естественных биогеоценозах, испытывающих на себе различное антропогенное воздействие. Результаты исследования отобранных образцов листьев подорожника большого показывают в целом экологически благополучное состояние изучаемого лекарственного растительного сырья. Все образцы удовлетворяют требованиям действующей нормативной документации по содержанию радионуклидов и водорастворимых полисахаридов. Выявлено, что изучаемые радионуклиды в имеющейся в сырье концентрации не оказали влияния на накопление водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого.

Ключевые слова: Центральное Черноземье, подорожник большой, радионуклиды, водорастворимые полисахариды.

EFFICIENCY AND RADIATIVE SAFETY OF MEDICINAL VEGETABLE RAW MATERIALS OF THE PLANTAIN BIG, COLLECTED IN THE CENTRAL BLACK EARTH

N. A. Dyakova^{1*}

Abstract. Accumulation of natural and artificial radionuclides and also biologically active agents in leaves of a plantain big, collected in the territory of the Voronezh region in the natural biogeocenoses which are influenced various anthropogenic influence is studied. Results of a research of the selected samples of leaves of a plantain big show, in general, ecologically safe condition of the studied medicinal vegetable raw materials. All samples meet requirements of the existing standard documentation on the maintenance of radionuclides and water-soluble polysaccharides. It is taped that the studied radionuclides in the concentration which is available in raw materials didn't exert impact on accumulation of water-soluble polysaccharides in leaves of a plantain big.

Keywords: Central Black Earth, plantain big, radionuclides, water-soluble polysaccharides.

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: office@main.vsu.ru

Ninotchka_V89@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть заготовок лекарственного растительного сырья сосредоточена в Центральном Черноземье. Освоение минеральных ресурсов, интенсивные технологии в сельском хозяйстве, связанные с использованием пестицидов, последствия Чернобыльской трагедии – все эти факторы резко обострили проблему обеспечения медицинской и фармацевтической промышленности растительным сырьем в полном объеме и ассортименте. Загрязненное лекарственное растительное сырье и фитопрепараты, полученные из него, являются одним из источников поступления поллютантов в организм человека [1, 2]. Одними из наиболее опасных загрязнителей биосферы в настоящее время считаются радионуклиды в силу их способности к миграции по биологическим цепям [3].

Целью исследования являлось изучение накопления естественных и искусственных радионуклидов, а также биологически активных веществ в листьях подорожника большого, собранного на территории Воронежской области в естественных биогеоценозах, испытывающих на себе различное антропогенное воздействие. Актуальность данного исследования заключается в научной оценке влияния экотоксикантов на живые организмы вообще и на лекарственное растительное сырье в частности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор исследуемых районов обусловлен характером специфического антропогенного воздействия на него (рисунок 1): химические предприятия ООО «Воронежский Гипрокаучук» (28), ОАО «Минудобрения» (23), ООО «Бормаш» (24);

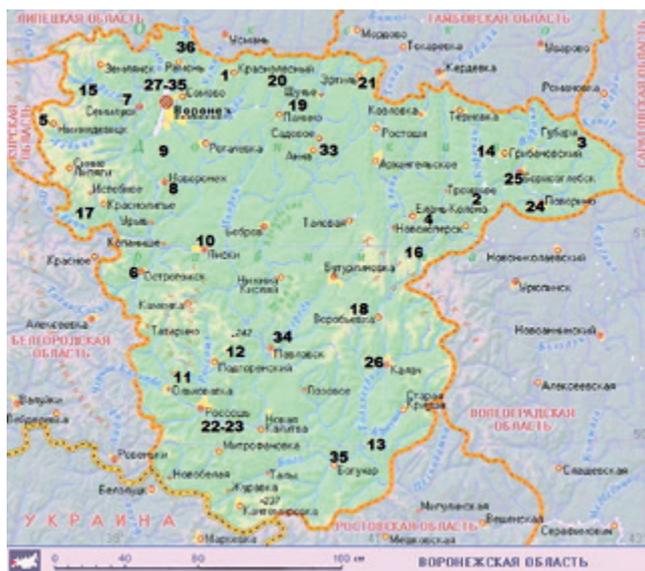


Рисунок 1. Карта отбора образцов почв и лекарственного растительного сырья (обозначения расшифрованы в тексте)

теплоэлектроцентраль «ВОГРЭС» (27), Нововоронежская атомная электростанция (АЭС) (8), Воронежский аэропорт (30), улица города (улица Ленинградская) (31), высоковольтные линии электропередач (ВЛЭ) (9), Воронежское водохранилище (29), малые города с развитой легкой промышленностью [Калач (26), Борисоглебск (25)], зона предполагаемой добычи никеля (4), зоны активной сельскохозяйственной деятельности [Лискинский (10), Ольховатский (11), Подгоренский (12), Петропавловский (13), Грибановский (14), Хохольский (15), Новохоперский (16), Репьевский (17), Воробьевский (18), Панинский (19), Эртильский (20), Верхнехавский (21), Россошанский (22) районы], зоны, подвергшиеся радионуклидному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС [Нижедевицкий (5), Острогожский (6), Семилукский (7) районы] и в качестве сравнения – заповедная зона [Воронежский биосферный заповедник (1), Хоперский государственный природный заповедник в Новохоперском (2) и в Борисоглебском районах (3)]. Кроме того, большое внимание уделено лекарственному растительному сырью, произрастающему вблизи автомобильных и железных дорог. Рассматривались разные природные зоны: лесная зона [Рамонский район (32)], лесостепь [Аннинский район (33)], степь [Павловский район (34)], где имеются крупные транспортные развязки трассы М4 «Дон», А144 Курск – Саратов. Также рассмотрены нескоростная автомобильная дорога [Богучарский район (35)] и железная дорога [Рамонский район (36)].

В качестве объекта исследования решено было использовать листья подорожника большого (*Plantago major* L.) – лекарственного растительного сырья, собираемого, как правило, от дикорастущих организмов, являющихся характерными представителями как естественных растительных сообществ, так и урбанофлоры. Водорастворимые полисахариды (ВРПС)

являются основной группой биологически активных веществ в листьях подорожника большого и обладают противовоспалительным, болеутоляющим, ранозаживляющим, отхаркивающим, антисептическим, иммуностимулирующим, мочегонным действием [4, 5].

Анализ образцов почв и лекарственного растительного сырья проводили на спектрометре-радиометре гамма-, бета- и альфа-излучения МКГБ-01 «РАДЭК» (ООО «НТЦ «РадЭК», Россия) с программным обеспечением ASW [6]. Взвешивание осуществляли с точностью до 0,0001 г на аналитических весах A&D GH-202 (AND, Япония). Проводили определение основных (долгоживущих) искусственных радионуклидов (стронций-90, цезий-137) и часто встречаемых в природе естественных радионуклидов (калий-40, торий-232, радий-226).



Аналитические весы A&D GH-202

Содержание ВРПС определяли по экспрессной гравиметрической методике с применением ультразвуковой ванны «Град 40-35» («Град-Технолоджи», Россия) для ускорения процесса экстракции [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований отобранных образцов лекарственного растительного сырья на содержание радионуклидов и ВРПС приведены в таблице 1.

Результаты исследования отобранных образцов листьев подорожника большого показывают в целом экологически благополучное состояние изучаемого лекарственного растительного сырья. Все образцы удовлетворяют требованиям действующей нормативной документации по содержанию искусственных радионуклидов. Нормирование в лекарственном растительном сырье природных радионуклидов в настоящее время отсутствует. Из таблицы 1 видно, что в большей степени листьями подорожника большого накапливается цезий-137 и калий-40. При этом активность радионуклидов варьирует: для цезия-137 они составляют от 54,1 до 163,1 Бк/кг, а для калия-40 – от 416 до 1197 Бк/кг. Поведение цезия-137 и, конечно, калия-40 при переходе из почвы в растения обычно связывают с поведением обменного калия. Основанием для этого является тот факт, что растения, которые содержат больше калия, обычно накапливают больше цезия-137. Калий-40 же накапливается в растениях аналогично его нерадиоактивным изотопам и в концентрациях, прямо пропорциональных концентрациям в природе. Цезий и калий – элементы одной группы периодической системы элементов, а потому механиз-

мы захвата из почвы и транспортировки в тканях растения ничем не отличаются. Распределение цезия-137 по отдельным органам и передвижение его внутри растения тесно связано с калием, в частности с калием-40 [8, 9].

Таблица 1.

Содержание радионуклидов и ВРПС в изучаемых образцах

№ п/п	Район сбора	Активность радионуклидов, Бк/кг					Содержание ВРПС, %
		Стронций-90	Цезий-137	Торий-232	Калий-40	Радий-226	
1.	Воронежский биосферный заповедник	6,4	115,9	12,4	416	4,8	24,1
2.	Хоперский заповедник	6,0	77,3	11,7	539	4,2	23,5
3.	Борисоглебский район (Губари)	6,1	63,9	14,3	606	3,9	24,5
4.	Елань-Колено	5,8	69,9	10,8	682	7,3	20,4
5.	Нижедевицк	10,4	123,3	9,8	689	8,6	18,4
6.	Острогжск	7,8	128,1	11,7	853	8,9	19,1
7.	Семилуки	8,9	163,1	9,3	716	10,1	17,9
8.	Нововоронеж	5,4	136,8	14,7	635	9,2	18,3
9.	Воронеж – Нововоронеж (ВЛЭ)	7,6	153,7	15,4	614	9,6	14,3
10.	Лискинский район	4,8	129,6	12,3	556	8,3	20,1
11.	Ольховатский район	5,9	136,1	13,0	718	8,4	19,0
12.	Подгоренский район	7,2	118,9	14,2	831	8,3	16,3
13.	Петропавловский район	6,3	79,5	14,5	854	8,7	17,5
14.	Грибановский район	6,4	61,3	17,4	704	10,2	16,9
15.	Хохольский район	7,8	142,9	16,5	918	10,1	17,0
16.	Новохоперский район	6,8	63,1	17,1	679	10,6	18,3
17.	Репьевский район	8,2	138,6	18,4	751	8,7	17,2
18.	Воробьевский район	5,3	64,3	19,5	653	8,2	18,0
19.	Панинский район	8,4	89,5	12,6	689	8,7	16,8
20.	Верхнехавский район	8,7	115,4	18,4	911	8,2	19,8
21.	Эртиль	8,9	81,2	13,3	937	9,3	20,2
22.	Россошанский район	7,2	105,7	16,5	983	8,0	15,7
23.	Россошь (химическое предприятие ОАО «Минудобрения»)	7,1	117,4	13,9	861	8,1	13,9
24.	Поворино	6,5	65,3	14,2	499	9,0	14,7
25.	Борисоглебск	6,7	54,1	12,1	673	7,6	18,4
26.	Калач	7,5	59,8	11,7	835	7,3	19,5
27.	Вблизи теплоэлектростанции «ВОГРЭС»	7,2	167,3	20,6	1072	10,2	19,1
28.	Вблизи химического предприятия по производству синтетического каучука ООО «Сибур»	7,4	157,6	18,5	1157	10,1	18,7

№ п/п	Район сбора	Активность радионуклидов, Бк/кг					Содержание ВРПС, %
		Стронций-90	Цезий-137	Торий-232	Калий-40	Радий-226	
29.	Вдоль низовья Воронежского водохранилища	8,3	140,6	17,3	1116	9,8	20,2
30.	Вблизи Воронежского аэропорта	6,2	89,1	16,4	531	7,4	16,4
31.	Улица города	9,3	146,3	11,5	1197	9,3	17,6
32.	Вдоль трассы М4 (Рамонский район)	7,2	97,6	10,6	534	7,0	12,4
33.	Вдоль трассы А144 (Анна)	5,4	116,8	13,7	678	4,5	12,9
34.	Вдоль трассы М4 (Павловск)	6,7	103,4	9,7	511	6,5	15,3
35.	Вдоль нескоростной автомобильной дороги (Богучар)	5,9	57,1	9,6	609	8,4	16,4
36.	Вдоль железной дороги (Рамонский район)	7,7	98,4	11,1	497	7,2	15,5
Среднее для Воронежской области		7,1	106,6	14,0	742	8,2	18,0
ПДК [3]		200	400	-	-	-	Не менее 12

Чувствительность водорастворимых полисахаридов листьев подорожника большого к антропогенному воздействию в условиях нашего эксперимента оценивается как низкая. Содержание водорастворимых полисахаридов в листьях растений, произрастающих в местах наиболее сильного антропогенного воздействия, несильно отличается от содержания водорастворимых полисахаридов в растениях, отобранных в экологически благополучных зонах. При этом все образцы оказались соответствующими требованиям нормативной документации.

Для детального анализа влияния содержания в растениях радионуклидов на накопление биологически активных веществ были рассчитаны коэффициенты корреляции (таблица 2) [10].

Таблица 2.

Коэффициенты корреляции между содержанием радионуклидов и ВРПС в листьях подорожника большого

Коэффициенты корреляции				
Стронций-90	Цезий-137	Торий-232	Калий-40	Радий-226
-0,07	-0,10	0,00	0,01	-0,31

По данным таблицы 2 можно судить об отсутствии влияния изучаемых радионуклидов на накопление ВРПС в листьях подорожника большого. Вероятно, это связано с низким содержанием радионуклидов в сырье, при котором никаких биохимических нарушений в растении не происходит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования отобранных образцов листьев подорожника большого показывают в целом экологически благополучное состояние изучаемого лекарственного растительного сырья. На накопление ВРПС листьев подорожника большого определяемые искусственные и природные радионуклиды выраженного влияния не оказали: образцы, собранные в экологически благоприятных зонах, мало отличаются по количественному содержанию ВРПС от образцов урбанофлоры и синантропной растительности. Это говорит об устойчивости данной группы биологически активных веществ к антропогенным влияниям, в частности к радиологическому воздействию. Дальнейшие исследования предполагается направить на изучение воздействия радионуклидов на накопление в разных видах лекарственного растительного сырья моносахаридов, флавоноидов и эфирных масел.

ЛИТЕРАТУРА

- Гапонов С. П. и др. Особенности накопления искусственных и природных радионуклидов травой тысячелистника обыкновенного // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016». – Воронеж: ИПЦ ВГУ. 2016. С. 236–239. [Gaponov S. P. i dr. Osobennosti nakopleniya iskusstvennykh i prirodnykh radionuklidov travoi tysyachelistnika obyknovennogo // Puti i formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Sozdanie novykh fiziologicheski aktivnykh veshchestv: Materialy 6-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii «Farmobrazovanie-2016». – Voronezh: IPTs VGU. [The accumulation of artificial and natural radionuclides of yarrow grass // Ways and forms of improving pharmaceutical education. Creation of new physiologically active substances: Materials of the 6th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2016". – Voronezh: CPI VSU.] 2016. S. 236–239.]
- Великанова Н. А., Гапонов С. П., Сливкин А. И. Экооценка лекарственного растительного сырья в урбоусловиях г. Воронежа – LAMBERT Academic Publishing. 2013. 211 с. [Velikanova N. A., Gaponov S. P., Slivkin A. I. Ekootsenka lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya v urbousloviyakh g. Voronezha – LAMBERT Academic Publishing. [Eco-evaluation of medicinal plant raw materials in Urban conditions in Voronezh – LAMBERT Academic Publishing.] 2013. 211 s.]
- Гапонов С. П. и др. Изучение особенностей накопления радионуклидов травой полыни горькой // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016». – Воронеж: ИПЦ ВГУ. 2016. С. 232–236. [Gaponov S. P. i dr. Izuchenie osobennosti nakopleniya radionuklidov travoi polyni gor'koi // Puti i formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Sozdanie novykh fiziologicheski aktivnykh veshchestv: Materialy 6-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii «Farmobrazovanie-2016». – Voronezh: IPTs VGU. [The study of the peculiarities of the accumulation of radionuclides by wormwood wormwood // Ways and forms of perfection of pharmaceutical education. Creation of new physiologically active substances: Materials of the 6th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2016". – Voronezh: CPI VSU.] 2016. S. 232–236.]
- Гапонов С. П. и др. Изучение содержания водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, произрастающего в городе Воронеже и его окрестностях // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013». – Воронеж: ИПЦ ВГУ. 2013. С. 251–254. [Gaponov S. P. i dr. Izuchenie soderzhaniya vodorastvorimykh polisakharidov v list'yakh podorozhnika bol'shogo, proizrastayushchego v gorode Voronezhe i ego okrestnostyakh // Puti i formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Sozdanie novykh fiziologicheski aktivnykh veshchestv: Materialy 5-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii «Farmobrazovanie-2013». – Voronezh: IPTs VGU. [Study of the content of water-soluble polysaccharides in plantain leaves of a large plant growing in the city of Voronezh and its environs // Ways and forms of improving pharmaceutical education. Creation of new physiologically active substances: Materials of the 5th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2013". – Voronezh: CPI VSU.] 2013. S. 251–254.]
- Великанова Н. А. и др. Усовершенствование методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013». – Воронеж: ИПЦ ВГУ. 2013. С. 216–220. [Velikanova N. A. i dr. Usovershenstvovanie metodiki kolichestvennogo opredeleniya vodorastvorimykh polisakharidov v list'yakh podorozhnika bol'shogo // Puti i formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Sozdanie novykh fiziologicheski aktivnykh veshchestv: Materialy 5-i Mezhdunarodnoi nauchno-metodicheskoi konferentsii «Farmobrazovanie-2013». – Voronezh: IPTs VGU. [Improvement of the technique of quantitative determination of water-soluble polysaccharides in the leaves of plantain large // Ways and forms of perfection of pharmaceutical education. Creation of new physiologically active substances: Materials of the 5th International Scientific and Methodological Conference "Pharmaceutical Education-2013". – Voronezh: CPI VSU.] 2013. S. 216–220.]
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIII. Т. 1. – М.: ФЭМБ, 2015. 1470 с.
- Патент РФ № 2530501. Способ получения водорастворимых полисахаридов из листьев подорожника большого / Великанова Н.А., Гапонов С.П., Сливкин А.И.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «ВГУ». – Заявл. 06.03.13; опубл. 10.10.14.
- Дьякова Н. А. и др. Оценка радионуклидного загрязнения лекарственного растительного сырья Воронежской области на примере корней лопуха обыкновенного // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 3. С. 110–115. [D'yakova N. A. i dr. Otsenka radionuklidnogo zagryazneniya lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya Voronezhskoi oblasti na primere kornei lopukha obyknovennogo // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. [Assessment of radionuclide contamination of medicinal plant raw materials in the Voronezh Region using the example of burdock roots of an ordinary burdock // Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.] 2016. № 3. S. 110–115.]
- Дьякова Н. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П. Изучение радионуклидного загрязнения лекарственного сырья Воронежской области на примере листьев подорожника большого и листьев крапивы двудомной // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. № 2. С. 118–123. [D'yakova N. A., Slivkin A. I., Gaponov S. P. Izuchenie radionuklidnogo zagryazneniya lekarstvennogo syr'ya Voronezhskoi oblasti na primere list'ev podorozhnika bol'shogo i list'ev krapiivy dvudomnoi // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. [A study of radionuclide contamination of medicinal raw materials in the Voronezh Region using the example of leaves of plantain large and leaves of nettle dioecious // Vestnik Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.] 2017. № 2. S. 118–123.]
- Общая теория статистики: Учебник / Под ред. Шмойловой Р. А. – Москва: Финансы и Статистика. 2004. 656 с.

УДК 615.32; 615.07; 582

ИЗУЧЕНИЕ САПОНИНОВ КОРНЕЙ СОЛОМОЦВЕТА ДВУЗУБОГО

Т. Н. Нгуен^{1*}, М. Г. Ожигова¹

Резюме. Приведено исследование сапонинов корней соломоцвета двузубого (*Achyranthes bidentata* Blume) семейства амарантовых (Amaranthaceae), собранного во Вьетнаме. Соломоцвет двузубый – тропическое растение из семейства амарантовых, являющееся очень популярным лекарственным растением в Азии. В корнях соломоцвета двузубого обнаружен комплекс биологически активных веществ (БАВ), в который входят сапонины, экидистероиды, полисахариды, алкалоиды и кумарины. В данной работе приведены качественный и количественный анализы сапонинов корней соломоцвета. В результате проведенных исследований установлено, что в корнях содержатся как минимум три сапонины преимущественно тритерпеновой группы, являющиеся производными олеаноловой кислоты. Методом спектрофотометрического анализа продуктов, полученных в результате реакции сапонинов с кислотой серной концентрированной, определено количественное содержание суммы сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту, которое составило $2,76 \pm 0,04\%$.

Ключевые слова: соломоцвет двузубый, корень, сапонины, олеаноловая кислота.

STUDY OF SAPONINS IN ROOTS OF ACHYRANTHES BIDENTATA BLUME

T. N. Nguyen^{1*}, M. G. Ozhigova¹

Abstract. To study saponins from the roots of *Achyranthes bidentata* Blume (Amaranthaceae) were collected in Vietnam. *Achyranthes bidentata* is a tropical plant in the Amaranthaceae family, which is the most popular medicinal plant in Asia. A complex of biologically active substances (BAS) was found in the roots of *Achyranthes bidentata* Blume that included saponins, ecdysteroids, polysaccharides, alkaloids, and coumarins. In this study, qualitative and quantitative analysis of saponins of *Achyranthes* roots was carried out. As a result of the studies, it was found that the roots contain at least three saponins predominantly triterpene group, which are derivatives of oleanolic acid. By spectrophotometric analysis of products obtained as a result of the reaction of saponins with concentrated sulfuric acid, the quantity of the content of saponins was defined, equivalent to oleanolic acid is equaled $2,76 \pm 0,04\%$.

Keywords: *Achyranthes bidentata*, root, saponin, oleanolic acid.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

* адресат для переписки:
E-mail: nganbn1504@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Соломоцвет двузубый – многолетнее травянистое растение, широко распространенное в восточноазиатских странах – Японии, Китае, Вьетнаме и Малаккском архипелаге. В России встречается на Дальнем Востоке, в Уссурийском крае [1].

Соломоцвет двузубый в качестве лекарства с древности используется в азиатской народной медицине для лечения различных заболеваний благодаря своим противовоспалительным, гипотензивным, диуретическим свойствам. Современными исследователями установлено, что соломоцвет двузубый обладает многими видами фармакологической активности – противовоспалительной, антибактериальной, иммуномодулирующей, антиоксидантной, антиостеопорозной, нейропротекторной и др. [2–6]. Водный экстракт *A. bidentata* ускоряет регенерацию нервов после травмы у кроликов. Фракцию полисахари-

дов *A. bidentata* возможно использовать в качестве нейропротектора для лечения поврежденных периферических нервов [2]. Экстракт корня *A. bidentata* эффективно предотвращает потери костной массы у крыс с удаленными яичниками и проявляет выраженный терапевтический эффект при лечении остеопороза [3]. Спиртовые экстракты из различных частей *A. bidentata* обладают высокой антибактериальной активностью и используются в качестве антибактериального средства, обладающего узким спектром активности [4]. Полисахариды корней активируют иммунную систему у старых мышей и крыс, обладают общеукрепляющим и тонизирующим действием [5]. Соломоцвет снижает содержание холестерина в крови, увеличивает тонус матки, замедляет ритм сердечных сокращений [6].

Во Вьетнаме соломоцвет двузубый включен в Государственную фармакопею IV издания [7]. Лекарственные препараты из этого растения наз-

начают при артритах, гипертонической болезни, атеросклерозе, мочекаменной болезни, гематурии, аменорее, воспалении слюнных желез, ларингитах [6, 8]. В китайской медицине корни этого растения применяют в качестве средства, восстанавливающего силы, а также как диуретическое, кровоостанавливающее, противовоспалительное средство. Используют как противоядие, наружно при заболеваниях кожи и ногтей. В Корее лекарства из корня этого растения используют при воспалительных процессах мочевого пузыря и уретры. В Японии отвары из корней *A. bidentata* применяют при артритах, ларингитах, гипертонии и атеросклерозе [8].

Корень соломоцвета двузубого содержит комплекс биологически активных соединений, таких как сапонины, экдистероиды, полисахариды, алкалоиды и кумарины [8, 9].

Противовоспалительное, противоревматическое, диуретическое и особенно гипотензивное фармакологическое действие связывают с наличием тритерпеновых сапонинов [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись корни соломоцвета двузубого, приобретенные в аптечной сети г. Ханой (Вьетнам), выпущенные в пачках фирмой VIET MEC (серия № 150, год сбора 2016).

Для определения наличия тритерпеновых сапонинов готовили водное и спиртовое извлечение [11].

Методика: 1,0 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в колбу объемом 50 мл, заливают 10 мл экстрагента и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После извлечения охлаждают под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 50 мл.

Наличие тритерпеновых соединений определяли в водных извлечениях с помощью реакции пенообразования [11].

Методика. Берут две пробирки с водным извлечением, в одну добавляют 5 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,1 моль/л, в другую – 5 мл раствора натрия гидроксида 0,1 моль/л и сильно встряхивают. При наличии в сырье тритерпеновых сапонинов в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и устойчивости. Если сырье содержит сапонины стероидной группы, то в среде щелочи образуется пена, в несколько раз большая по объему и устойчивости [11].

Для подтверждения наличия тритерпеновых сапонинов, а также их агликонов осуществляли тонкослойную хроматографию на пластинках Sorbfil в различных системах растворителей: хлороформ – этилацетат (9:1), бензол – ацетон (3:1), н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) [12].

Методика получения извлечения сапонинов.

Извлечение биологически активных соединений из сырья получали с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70% [11].

Для определения агликонов сапонинов осуществляли гидролиз полученного выше извлечения: отбирали аликвоту объемом 5 мл и выпаривали под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяли в 10 мл смеси для гидролиза. Смесь растворителей для гидролиза готовили, используя кислоту ледяную уксусную, кислоту хлористоводородную концентрированную, воду очищенную; для этого компоненты смешивали, соблюдая соотношение объемов (3,5:1:5,5), затем помещали в круглодонную колбу для гидролиза и нагревали на водяной бане в течение 2 ч с момента закипания бани. Затем гидролизную смесь разбавляли водой очищенной в соотношении 1:2, выпавший осадок отделяли фильтрованием через плотный бумажный фильтр «зеленая лента». Осадок на фильтре промывали водой очищенной, растворяли в 25 мл горячего спирта этилового 95%. После хроматографирования пластинки обрабатывали раствором кислоты серной 20%, высушивали в сушильном шкафу в течение 10 мин при температуре 100–105 °С. При этом на хроматографической пластинке проявлялись пятна фиолетового цвета.

В качестве свидетеля использовали стандартный образец (СО) кислоты олеаноловой (AK Scientific, США).

Определение содержания суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили по методике, основанной на способности поглощения продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра. В результате этой реакции тритерпеноиды протонируются по двойной связи с образованием карбокатиона в положении С-28 с последующей лактонизацией. При этом наблюдается характерный максимум поглощения при 310 нм [13].

Методика. Около 1,0 г измельченного воздушно-сухого сырья корней соломоцвета двузубого трехкратно экстрагируют спиртом этиловым 70% порциями по 15 мл по 1 часу на кипящей водяной бане с обратным холодильником в круглодонной колбе объемом 50 мл. Полученные извлечения фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» и объединяют в мерную колбу объемом 50 мл, недостающий объем восполняют экстрагентом (раствор А). Далее из полученного извлечения отбирают аликвоту объемом 5 мл и выпаривают под вакуумом досуха. Гидролиз проводят по методике, описанной выше. Осадок на фильтре промывают очищенной водой, растворяют в 25 мл спирта этилового 95% и помещают в мерную колбу объемом 25 мл (раствор Б).

К 1 мл полученного раствора прибавляют 4 мл кислоты серной концентрированной, выдерживают 10 мин и определяют оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu UV-1240 в кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм в области 220–450 нм. Раствор сравнения – кислота серная концентрированная.

Параллельно определяют оптическую плотность стандартного раствора олеаноловой кислоты в аналогичных условиях проведения эксперимента.

Приготовление раствора СО олеаноловой кислоты. Около 0,0052 г (точная навеска) СО кислоты олеаноловой переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте этиловом 95% и доводят объем раствора до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы сапонинов в корнях соломоцвета двузубого в пересчете на олеаноловую кислоту проводят по формуле:

$$X\% = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_x \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность исследуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО олеаноловой кислоты; m_0 – масса СО олеаноловой кислоты в г; m_x – масса сырья в г; W – потеря в массе сырья при высушивании (5,88%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате реакции пенообразования полученного извлечения с растворами гидроксида натрия и хлористоводородной кислотой в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и устойчивости, что свидетельствует о наличии в корнях соломоцвета двузубого сапонинов преимущественно тритерпеновой структуры [11].

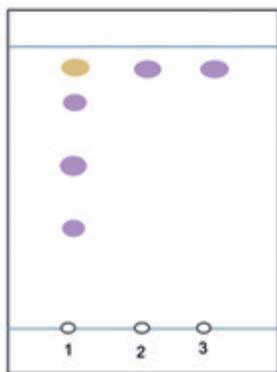


Рисунок 1. ТСХ-анализ. Система: н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5); пластинка Sorbfil, детекция – обработка раствором кислоты серной 20% с последующим нагревом в течение 10 мин при температуре 100–105 °С. Обозначения: 1 – спиртоводное извлечение корней; 2 – спиртоводное извлечение после гидролиза; 3 – СО кислоты олеаноловой

В результате проведения хроматографии в тонком слое сорбента наиболее четкое разделение пятен сапонинов наблюдалось в системе растворителей н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) (рисунок 1). После детекции хроматограмм спиртоводного извлечения проявлялось 4 пятна: одно коричневого и три фиолетового цвета со значениями R_f 0,44±0,01; 0,57±0,02; 0,78±0,01; 0,90±0,01. Извлечение после гидролиза на

хроматограмме проявлялось в виде одного пятна, совпадающего со стандартом олеаноловой кислоты по окраске (фиолетового цвета) и значению R_f (0,90±0,01), что позволяет предположить, что сапонины соломоцвета являются производными олеаноловой кислоты (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты идентификации сапонинов корней соломоцвета двузубого методом ТСХ в системе н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) до и после гидролиза

№ пятна	R_f	Цвет пятна после обработки 20% раствором серной кислоты и нагревания		
		Спиртовое извлечение	Спиртовое извлечение после гидролиза	СО кислоты олеаноловой
1	0,90±0,01	коричневый	фиолетовый	фиолетовый
2	0,78±0,01	фиолетовый	–	–
3	0,57±0,02	фиолетовый	–	–
4	0,44±0,01	фиолетовый	–	–

Количественное определение суммы сапонинов проводили по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра при 310 нм (рисунок 2) [12].

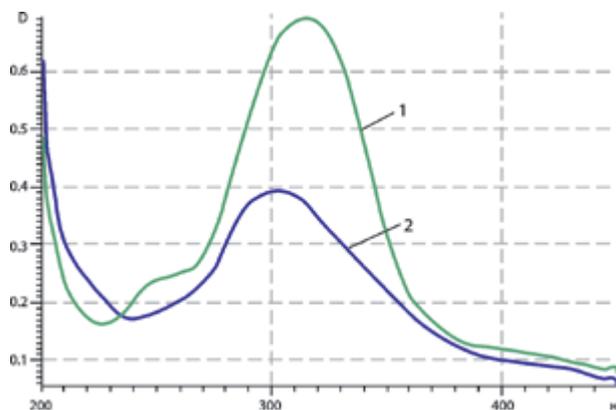


Рисунок 2. Спектры поглощения СО олеаноловой кислоты и сапонинов в корнях соломоцвета двузубого.

1 – СО кислоты олеаноловой; 2 – сапонины в корнях соломоцвета двузубого после гидролиза

В результате статистической обработки данных четырех параллельных измерений установлено, что общее содержание сапонинов в корнях соломоцвета двузубого в пересчете на олеаноловую кислоту составило 2,76±0,04%. Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 составила 1,27% (таблица 2).

Таблица 2.

Результаты количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту

$X_i(\%)$	$X_{cp}-X_i$	$(X_{cp}-X_i)^2$	Метрологические характеристики
2,79	0,03	0,0009	$X_{cp}=2,76$ $S^2=6,3 \cdot 10^{-4}$ $S=0,025$ $P=0,95$ $t(P,f)=2,78$ $\Delta x=0,04$ $E=1,27\%$
2,76	0	0	
2,73	0,03	0,0009	
2,75	0,01	0,0001	
$X_{cp}=2,76$		$\Sigma=0,0019$	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в корнях соломоцвета двузубого содержатся сапонины преимущественно тритерпеновой группы. При хроматографировании спиртоводного извлечения из корней в тонком слое силикагеля в системе растворителей н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) после обработки раствором кислоты серной 20% с последующим нагревом в течение 10 мин при температуре 100–105 °С проявлялось 4 пятна: одно коричневого и три фиолетового цвета. После гидролиза в смеси кислоты ледяной уксусной, кислоты хлористоводородной концентрированной и воды очищенной на хроматограмме в тех же условиях проявлялось 1 пятно фиолетового цвета, совпадающее по окраске и значению R_f (0,90±0,01) со стандартом олеаноловой кислоты. На основании этого можно сделать вывод о том, что в корнях соломоцвета содержатся как минимум три сапонины, производных олеаноловой кислоты.

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили методом прямой спектрофотометрии по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой при длине волны 310 нм. Содержание сапонинов в корнях соломоцвета составило 2,76±0,04% при относительной ошибке 1,27% с доверительной вероятностью 0,95.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Xirui H. et al.* The genus *Achyranthes*: A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities // *Journal of ethnopharmacology* 2017. V. 203. P. 260–278.
2. *Cheng Qiong et al.* Neurotrophic and neuroprotective actions of *Achyranthes bidentata* polypeptides on cultured dorsal root ganglia of rats and on crushed common peroneal nerve of rabbits // *Neuroscience letters*. 2014. № 562. P. 7–12.
3. *He Cui-Cui et al.* Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes bidentata* in ovariectomized rats // *Journal of ethnopharmacology*. 2010. V. 2. № 127. P. 229–234.
4. *P.U. Devi et al.* Antibacterial, in vitro lipid peroxidation and phytochemical observation on *Achyranthes bidentata* Blume // *Pakistan Journal of Nutrition*. 2007. V. 6. № 5. P. 447–451.
5. *Li Z. K., Li D. D.* The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides // *Yao xue xue bao – Acta pharmaceutica Sinica*. 1997. V. 12. № 32. P. 881–887.
6. *Do Tat Loi.* Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam // *NxbY Hoc*. 2004. Trang 48–49.
7. *Вьетнамская фармакопея.* IV изд. 2010. С. 882.
8. *Yanze L., Wang Z., Zhang J.* *Dietary Chinese Herbs*. – Vienna: Springer. 2015. P. 45–48.
9. *Marouf A. et al.* Triterpene saponins from the roots of *Achyranthes bidentata* // *Pharmaceutical biology*. 2001. V. 4. № 39. С. 263–267.
10. *Wang L., Zhu Y., Liao M.* Therapeutic effects of saponins from *Achyranthes bidentata* in SHRsp // *Zhongguo Zhong yao za zhi – China journal of Chinese materia medica*. 2011. V. 9. № 36. P. 1239–1241.
11. *Ковалев В. Н., Попова Н. В., Кисличенко В. С. и др.* Практикум по фармакогнозии / Под общ. ред. Ковалева В. Н. – Харьков: Изд-во НФаУ; Золотые страницы. 2003. С. 512. [Kovalev V. N., Popova N. V., Kislichenko V. S. i dr. *Praktikum po farmakognozii / Pod obshch. red. Kovaleva V. N.* – Khar'kov: Izd-vo NfaU; Zolotyie stranitsy. [Workshop on pharmacognosy / Under the Society. Ed. Kovalev V. N. – Kharkov: Publishing house of NfaU; Golden Pages.] 2003. С. 512.]
12. *Федосеева Л. М., Башар Д. Б.* Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской // *Химия растительного сырья*. 2016. № 1. С. 181–184. [Fedoseeva L. M., Bashar D. B. *Izuchenie saponinov v podzemnykh organakh feruly khermonskoi // Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. [The study of saponins in the underground organs of the ferul of Hermon // *Chemistry of plant raw materials*.] 2016. № 1. С. 181–184.]
13. *Писарев Д. И. и др.* Сапонины и их определение в корневищах аралии маньчжурской в условиях Белгородской области // *Химия растительного сырья*. 2009. № 4. С. 197–198. [Pisarev D. I. i dr. *Saponiny i ikh opredelenie v kornevishchakh aralii man'chzhurskoi v usloviyakh Belgorodskoi oblasti // Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. [Saponins and their determination in the rhizomes of Manchurian aralia in the conditions of the Belgorod region // *Chemistry of plant raw materials*.] 2009. № 4. С. 197–198.]

УДК 615.322; 582.949.2; 546.06; 543.421

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ТРАВЫ КОТОВНИКА КОШАЧЬЕГО (*NEPETA CATARIA L.*) ИЗ РАЗНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ

И. И. Тернинко¹, Т. Х. И. Нгуен^{1*}, Ю. Э. Генералова¹

Резюме. Приведены результаты сравнительного изучения методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой минерального состава травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria L.*), произрастающего на территории Ленинградской и Белгородской областей. В траве котовника из Ленинградской и Белгородской областей обнаружено 16 и 18 элементов соответственно с максимальным содержанием Ca, Mg, K, Fe и Al, которые можно рассматривать как основные минеральные элементы данного растения. Накопление и распределение Cu, Mg, Na определено как дополнительный химический маркер для травы котовника. Полученные результаты позволяют рассматривать котовник кошачий в качестве потенциального источника минеральных элементов.

Ключевые слова: минеральный состав, котовник кошачий, почва.

COMPARATIVE STUDY OF MINERAL COMPOSITION OF CATNIP HERB (*NEPETA CATARIA L.*) FROM DIFFERENT REGIONS

I. I. Terninko¹, T. H. Y. Nguyen^{1*}, Yu. E. Generalova¹

Abstract. The results of comparative study of the mineral composition by the inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry method of catnip herb (*Nepeta cataria L.*) which growing on the territory of the Leningrad Region and the Belgorod Region are presented. 16 and 18 elements were found in the herb from the Leningrad and Belgorod regions, respectively, with the maximum content of Ca, Mg, K, Fe and Al, which can be considered as the main mineral elements of this plant. The accumulation and distribution of Cu, Mg, Na is defined as an additional chemical marker for herb catnip. The results obtained allow us to consider the catnip herb as a potential source of mineral elements.

Keywords: mineral composition, *Nepeta cataria L.*, soil.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

* адресат для переписки:

E-mail: nguyenhaiyen20190@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Nepeta cataria L. (котовник кошачий) – травянистое многолетнее растение из семейства яснотковых (*Lamiaceae*), которое традиционно используется в этномедицине разных стран в качестве седативного средства. В эксперименте котовник оказывает спазмолитическое, антимикробное, антиоксидантное, иммуностимулирующее и противоопухолевое действие [1–4].

Фармакологические свойства *Nepeta cataria L.* определяются разнообразными биологически активными веществами (БАВ), которые относятся к различным группам: фенольным соединениям (в том числе флавоноидам и гидроксикоричным кислотам), эфирным маслам, стероидным соединениям и др. [5–7]. Значительная роль в биосинтезе БАВ отводится макро- и микроэлементам. Так, например, Cu, Mn, K, Zn, B, Co способствуют биосинтезу фенольных, а Mo, V, Mn,



Cu, Sr – тритерпеновых соединений [8]. Кроме того, макро- и микроэлементы способны в составе комплексов БАВ влиять на фармакологический эффект лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

Определение минерального состава дает возможность прогнозировать профиль эффективности и безопасности ЛРС, так как, с одной стороны, элементы обладают собственной терапевтической активностью, а с другой, важно оценить уровень токсичных элементов (кадмия, свинца, ртути и мышьяка).

В литературе [9–12] имеются данные по изучению минерального состава некоторых представителей рода *Nepeta* L. Однако сведения о минеральном составе вида *Nepeta cataria* L. в литературе не носят системного характера. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о сравнительном изучении элементного состава травы котовника в зависимости от региона произрастания, а также нет оценки накопления отдельных элементов из почвы.

В связи с этим целью данной работы было исследование минерального состава травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) из разных мест произрастания растения и оценка способности накапливать отдельные элементы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования служили образцы травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.), заготовленные на территории питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ (пос. Лемболово Всеволожского района Ленинградской области) и с дикорастущих растений в районе г. Новый Оскол Белгородской области. Траву заготавливали в фазе цветения в период с мая по октябрь 2017 г. Заготовку надземной части (травы) проводили в сухую погоду на расстоянии 10 см от поверхности земли, избегая попадания грубых (одревесневших) частей растения. Сушку проводили воздушно-теньевым способом. Пробы почвы из зон произрастания растений отбирались способом конверта с глубины 20 см.

Определение минерального состава травы котовника и образцов почвы проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре Optima 8000 (Perkin Elmer Inc., США) на базе центра контроля качества лекарственных средств ФГБОУ ВО СПХФУ. Подготовку пробы почвы и растительных образцов к анализу осуществляли по методике, предложенной в программе спектрометра, в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIII, ОФС.1.5.3.0009.15 [13]. Пробоподготовка заключалась в обработке 600 мг сухой навески образца 10 мл концентрированной азотной кислоты (ос.ч., 18-4, ЗАО «Вектон», Россия) и 6 мл концентрированной перекиси водорода (ос.ч., ООО «НеваРеактив», Россия) с последующей микроволновой обработкой в системе Speedwave Entry DAP-60K (Berghof GmbH,

Германия) в тefлоновом, герметично закрытом сосуде (бомбе). Затем остаток переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки бидистиллированной водой. Рабочие параметры прибора: скорость подачи образца – 1,5 мл/мин, положение обзора эмиссии – аксиальный, время интегрирования – 3–5 с, число повторов интегрирования – 3, диапазон длин волн – 213–770 нм, скорость потока плазмообразующего газа – 10 л/мин, скорость потока дополнительного газа – 0,2 л/мин, скорость потока газа для распыления пробы – 0,55 л/мин, мощность плазмы – 1300 Вт. Анализ, а также расчеты содержания отдельных элементов проводили в соответствии с требованиями ПО прибора и ОФС.1.2.1.1.0004.15 ГФ РФ XIII [13].

Растворы металлов с известными концентрациями, используемые для градуировки спектрометра, готовили посредством разбавления стандартных образцов, в качестве которых использовали мультиэлементный стандарт и ртуть в 5% растворе азотной кислоты в концентрации 10 мкг/мл (таблица 1).

Таблица 1.

Стандартные образцы

Мультиэлементный стандарт	Multi-element Calibration Standard 3, Matrix per Volume: 5% HNO ₃ per 125 ml, стандартный образец-раствор, содержание Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U, V – 10 µg/ml, Perkin Elmer Inc., США, PE № 9300233, CAS: HNO ₃ [7697-37-2], серия CL3-151MKBY1, годен до 30.11.18
Ртуть	Mercury Standard, 10µg/ml Hg in 5% HNO ₃ , стандартный образец-раствор, содержание Hg – 10 µg/ml в 5% HNO ₃ , Perkin Elmer Inc., США, PE № 9300253, CAS: Hg [7439-97-6]; HNO ₃ [7697-37-2], серия CL9-102HGY1, годен до 30.11.18

По результатам исследования вычисляли коэффициент биологического поглощения (КБП), который характеризует накопление элементов растительным сырьем, представляет собой отношение содержания микроэлемента в золе растения к его содержанию в почве и рассчитывается по формуле, приведенной в литературе [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам исследования макро- и микроэлементов в траве и почве различных климатикогеографических зон произрастания установлено, что элементный профиль котовника из разных регионов различается по уровню содержания элементов. Было определено содержание 16 элементов в траве котовника из Ленинградской области и 19 элементов в траве из Белгородской области (таблица 2).

Анализ распределения макро- и микроэлементов свидетельствует, что в траве котовника преобладают элементы Ca, Mg, K, Fe и Al. Это вполне объяснимо,

Таблица 2.

Минеральный состав травы *Nepeta cataria* L. и почвы с мест произрастания, мг/кг

Элемент	Ленинградская область			Белгородская область		
	Содержание		КБП	Содержание		КБП
	травя	почва		травя	почва	
Al	964,17	6091,21	0,16	325,17	8240,04	0,04
As (ПДК 0,5 мг/кг)	–	–	–	9,77 (!)	–	≈9,77
Ba	51,54	46,61	1,11	9,27	50,27	0,18
Ca	23407,47	9011,94	2,60	18476,82	52599,57	0,35
Cd (ПДК 1,0 мг/кг)	0,04	0,24	0,17	0,66	0,22	3,08
Cr	4,74	6,57	0,72	1,16	16,33	0,07
Cu	5,64	2,52	2,24	11,42	6,54	1,75
Fe	1596,65	24066,23	0,07	203,97	36017,22	0,01
K	2287,89	610,75	3,75	1652,9	3016,68	0,55
Li	0,80	4,75	0,17	114,57	8,56	13,39
Mg	4001,24	543,16	7,37	4813,95	2316,47	2,08
Mn	201,54	2916,40	0,07	31,95	605,49	0,05
Na	32,31	25,11	1,29	140,70	63,89	2,20
Ni	3,48	3,85	0,90	5,63	14,50	0,39
Pb (ПДК 6,0 мг/кг)	1,11	4,72	0,24	–	–	–
Se	–	–	–	22,68	–	≈22,68
Sr	–	–	–	197,51	–	≈197,51
Zn	20,00	26,19	0,76	38,70	26,21	1,48
Hg (ПДК 0,1 мг/кг)	0,21 (!)	–	≈0,21	3,48 (!)	0,16	21,53
Rb	–	–	–	81,29	–	≈81,29

Примечание: ■ выделены элементы, которые накапливаются в ЛРС.

так как они являются элементами, необходимыми для физиологических процессов в растениях: Mg выполняет большую роль в процессе фотосинтеза, метаболизме фенольных соединений, входит в состав хлорофилла [15]; Ca и K участвуют в регуляции роста и развития, защите от патогенных влияний; Fe участвует в процессах фотосинтеза, фиксации азота, окислительно-восстановительных реакциях; Al контролирует коллоидные свойства в клетке [8].

Ряд убывающих концентраций элементов в образцах травы котовника из Ленинградской и Белгородской областей произрастания характеризуется следующей закономерностью: Ca>Mg>K>Fe>Al>Mn>Ba>Na>Zn>Cu>Cr>Ni>Pb>Li>Hg>Cd и K>Ca>Mg>Al>Fe>Sr>Na>Li>Rb>Zn>Mn>Se>Cu>As>Ba>Ni>Hg>Cr>Cd соответственно (рисунок 1). Присутствие некоторых элементов только в сырье (Hg – в сырье из Ленинградской области; As, Se, Sr, Rb – в сырье из Белгородской области) говорит о том, что в данных местах загрязнение этими элементами может происходить непосредственно воздушным путем.

В сырье котовника из Ленинградской области содержание токсических элементов (кадмия, свин-

ца и мышьяка) находится в допустимых фармакопеей пределах, а содержание ртути превышает ПДК в 2 раза. Однако ртуть, содержание которой в сырье составляет 0,21 мг/кг, не идентифицирована в почве, то есть можно сделать вывод о концентрировании травы котовника данного элемента при различных путях поступления.

В почвенных образцах Белгородской области по сравнению с условно экологически чистым районом Ленинградской области содержание элементов выше. В траве котовника из Белгородской области наблюдалось превышение ПДК мышьяка в 20 раз и ртути почти в 30 раз. Таким образом, можно сделать вывод, что регион Белгородской области непригоден для заготовки травы котовника в связи с высоким профилем токсичности сырья. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о детоксикационной способности травы котовника.

Для оценки интенсивности поглощения химических элементов травой котовника из почвы были рассчитаны КБП (таблица 2). В зависимости от места произрастания интенсивность поглощения элементов

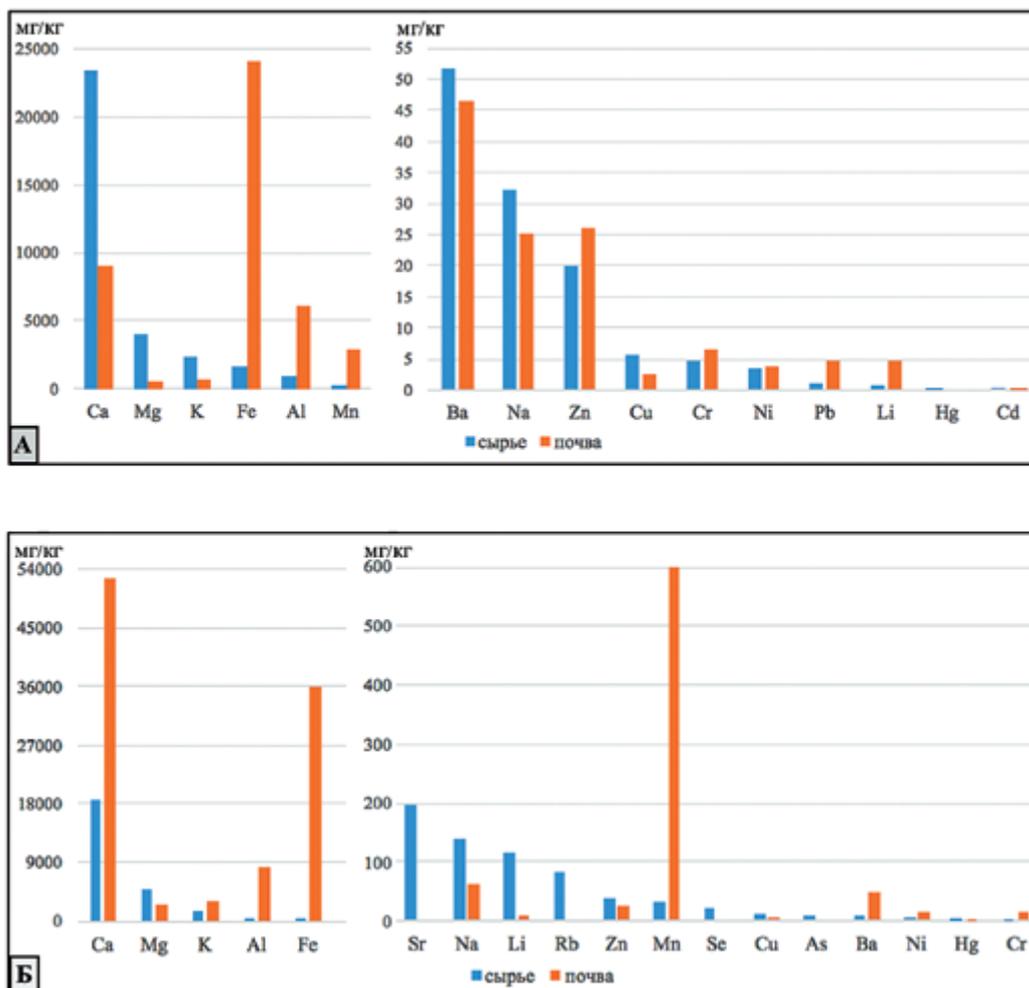


Рисунок 1. Ряд убывающих концентраций минеральных элементов (мг/кг) в траве котовника и почве из Ленинградской области (А) и Белгородской области (Б)

травой котовника различается. Согласно рядум КБП по шкале Н.Ф. Ганжара (2007) [14] в траве котовника из Ленинградской и Белгородской областей элементами энергичного и сильного накопления (КБП>1) являются Ba, Ca, Cu, K, Mg, Na и Li, Se, Sr, Hg, Rb, As, Cd, Cu, Mg, Na, Zn соответственно; слабого накопления и среднего захвата (1>КБП>0,1) – Al, Cd, Cr, Li, Ni, Pb, Zn, Hg и Ba, Ca, K, Ni; элементы слабого захвата (КБП<0,1) – Fe, Mn и Al, Cr, Fe, Mn.

Установлено, что котовник вне зависимости от места произрастания является накопителем Cu, Mg, Na. По убыванию данные элементы распределены следующим образом: Mg>Na>Cu. Это позволяет рассматривать накопление и распределение данных элементов как дополнительный химический маркер для травы котовника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В траве котовника из Ленинградской и Белгородской областей обнаружено 16 и 18 элементов соответственно с максимальным содержанием
2. Установлены особенности накопления отдельных элементов в траве котовника, а именно ряд убывающих концентраций Ba, Ca, Cu, K, Mg, Na и Li, Se, Sr, Hg, Rb, As, Cd, Cu, Mg, Na, Zn для образцов из Ленинградской и Белгородской областей соответственно, в том числе накопление и распределение Cu, Mg, Na, которые обозначены как элементные маркеры котовника.
3. Установлено, что трава котовника обладает детоксикационной способностью, что обусловлено избирательным накоплением токсических элементов (ртути, мышьяка и кадмия), концентрация которых в образцах травы выше, чем в почве.
4. Установлено, что регион Белгородской области непригоден для заготовки травы котовника в связи с высоким профилем токсичности сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adiguzel A. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria* // Polish Journal of Microbiology. 2009. V. 58. № 1. P. 69–76.
2. Fan J. et al. Mechanism of modulation through PI3K-AKT pathway about *Nepeta cataria* L.'s extract in non-small cell lung cancer // Oncotarget. 2017. V. 8. № 19. P. 31395.
3. Duda S. C. et al. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species // Industrial Crops and Products. 2015. V. 77. P. 499–507.
4. Prescott T. A. K. et al. Direct inhibition of calcineurin by caffeoyl phenylethanoid glycosides from *Teucrium chamaedrys* and *Nepeta cataria* // Journal of ethnopharmacology. 2011. V. 137. № 3. P. 1306–1310.
5. Тернинко И. И., Нгуен Иен Тхи Хай. Идентификация фенольных соединений в траве котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1. С. 120–124. [Terninko I. I., Nguen Ien Tkhi Khai. Identifikatsiya fenol'nykh soedinenii v trave kotovnika koshach'ego (*Nepeta sataria* L.) // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2017. № 1. S. 120–124.]
6. Naguib A. M. M. et al. Phytochemical screening of *Nepeta cataria* extracts and their in vitro inhibitory effects on free radicals and carbohydrate-metabolising enzymes // Natural product research. 2011. V. 26. № 23. P. 2196–2198.
7. Gilani A. H. et al. Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L. // Journal of ethnopharmacology. 2009. V. 121. № 3. P. 405–411.
8. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях / Пер. с англ. – М.: Мир. 1989. 439 с. [Kabata-Pendias A., Pendias Kh. Mikroelementy v pochvakh i rasteniyakh [Microelements in soils and plants.] Per. s angl. – М.: Mir. 1989. 439 s.]
9. Koche D. Trace element analysis and vitamins from an Indian medicinal plant *Nepeta hindostana* (ROTH) Haines // Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sci. 2010. V. 3. P. 53–54.
10. Ortobaeva F. S., Chelombit'ko V. A. Amino acid and mineral composition of *Nepeta grandiflora* // Chemistry of Natural Compounds. 2007. V. 43. № 3. P. 367–368.
11. Hussain J. et al. Evaluation of the Chemical Composition and Trace Elements Analysis of *Nepeta suaveis* and *Phlomis bracteosa* belonging to Family Labitae // Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2009. V. 6. № 6. P. 651–656.
12. Khilik L. A., Bondarenko T. I. Features of mineral nutrition of *Nepeta transcaucasica* in irrigated and dryland conditions // Агрохимия. 1976. Т. 5. С. 85–90.
13. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. – М., 2015. Т. 1. 1470 с.; Т. 2. 1004 с. URL: <http://femb.ru/feml> (дата обращения 10.03.2018).
14. Ганжара Н. Ф., Байбеков Р. Ф., Бойко О. С., Колтыхов Д. С., Арешин А. В. Геология и ландшафтоведение. – М.: Т-во науч. изданий КМК. 2007. 380 с. 56 с. вкл. [Ganzhara N. F., Baibekov R. F., Boiko O. S., Koltykhov D. S., Areshin A. V. Geologiya i landshaftovedenis. – М.: Т-во научн. izdaniy КМК. [Geology and landscape studies.] 2007. 380 s. 56 s. vкл.]
15. Запрометов. М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функция в растениях. – М.: Наука, 1993. 272 с. [Zaprometov. M. N. Fenol'nye soedineniya: rasprostraneniye, metabolizm i funktsiya v rasteniyakh. [Phenolic compounds: distribution, metabolism and function in plants.] – М.: Nauka, 1993. 272 s.]

visiopharma
Serialization Solutions

visiopharma
InkJet Station

**IJS -
200
Series**

**КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ
по сериализации и агрегации**

VI партнеринг

«Лекарства России — к междисциплинарному диалогу»

г. Калининград, отель Radisson, 21 сентября 2018 г.



Организатор: Ассоциация Российских фармацевтических производителей

При поддержке: Министерства здравоохранения Калининградской области

Контакты:

АРФП: 101000, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 22, стр. 1

тел: +7 (495) 231-42-53, факс: +7 (495) 231-42-54; e-mail: arfp@arfp.ru; www.arfp.ru

УДК 574/577; 502/504; 502; 051; 313; 330.15

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

Б. А. Комаров^{1*}

Резюме. Перечислены известные в тысячелистнике органические вещества, обуславливающие его действие как лекарственного растения. Показано существенное влияние территориального происхождения на микроэлементный состав тысячелистника. Делается заключение о необходимости контроля с помощью современных методов содержания микроэлементов, включая элемент германий, как в исходном растительном сырье, так и в экстрагируемых из растений веществах.

Ключевые слова: тысячелистник, микроэлементы, происхождение.

THE ELEMENTAL COMPOSITION OF YARROW

B. A. Komarov^{1*}

Abstract. The known organic substances in yarrow causing its herbal effect are listed. A substantial influence of the territorial origin on the microelement composition of yarrow is shown. It is concluded that the content of microelements, including germanium, must be controlled using the modern methods of determination.

Keywords: yarrow, microelements, origin.

1 – ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, 142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка, ул. Акад. Н. Н. Семёнова, д. 1

1 – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 1, Akad. Semenova str., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: komarov@chgnnet.ru
Тел.: 8 (496) 522 16 25

ВВЕДЕНИЕ

Сначала немного о предыстории. Трескунов Карп Абрамович (19.01.1919 – 27.01.2016) – мой лечащий врач с 1980 г. – приглашен в 1970 г. Ф. И. Дубовицким (основателем наукограда вместе с академиком Н. Н. Семёновым) в Черноголовку, как уникальный практический врач-исследователь, кандидат медицинских наук, подполковник медицинской службы, главный терапевт армии Калининградского военного округа со специфическим многолетним (с 1943 г.) опытом врачебной деятельности. В январе 1984 г. вместе с главным врачом больницы В. И. Головкиным направляют меня в академическую больницу на Ленинском проспекте в Москве на обследование по причине затруднения установления диагноза отклонения от нормального функционирования внутренних органов.

После обследования, убедившись в отсутствии эффективных методов лечения, я предложил лечить себя хитозаном, с которым работал в ИПХФ РАН с 1979 г., имел определенный опыт и два патента по применению в технических областях. Тогда для меня, как химика-экспериментатора,

стало ясно, что защита пищевода, печени и поджелудочной железы должна быть постоянной и регулярной изнутри (при самотеке в данном случае, как мне сказали после обследования, неминуема смерть быстрая, но мучительная).

Однако в стране в 1984 г. ещё не было пищевого хитозана. После 6–7 лет исследований удалось получить хитозан с заданными молекулярными характеристиками, свободный от тяжелых металлов и белка в соответствии с пределом допустимой их концентрации. Активно в лечебной практике К. А. Трескунов стал применять сначала хитодез, а потом и фитохитодез с 1992 г. В 1997 г. занялись патентованием. В настоящее время способы получения и применения защищены 11 патентами РФ.

Анализ сборов лекарственных растений для получения фитохитодезов показал, что в большинстве случаев основным их компонентом является тысячелистник. Почему?

Из различных источников по фитотерапии [1–2] известно, что в тысячелистнике действующим началом являются следующие вещества. Хинаголид и гермакранолид (сесквитерпеновые

g-лактоны) оказывают желчегонное действие. Дубильные вещества, эфирное масло, бетуленол и хамазулен обеспечивают противовоспалительное, бактерицидное, противоаллергическое и ранозаживляющее действие. Флавоноиды, фенилпропаноиды и эфирное масло – спазмолитическое действие на гладкие мышцы. Ахиллеин (горький алкалоид) раздражает окончания вкусовых нервов и усиливает секрецию. Комплекс веществ активизирует действие фибрина, но не приводит к образованию тромбов: кровоостанавливающее действие сходно с эффектом ионов кальция, легкоусвояемые формы которого в тысячелистнике имеются в макроколичестве.

Из истории известно, что в армиях Александра Македонского широко применялись галеновые экстракты тысячелистника (К. Гален, 131–201 гг. н.э.), а солдаты Александра Суворова в личной аптечке имели тысячелистник в виде растертого порошка в качестве кровоостанавливающего средства. А совсем недавно группа ученых Курского государственного университета установила иммуномодулирующую активность полисахаридного комплекса (ПСК), выделенного из тысячелистника благородного [2]. ПСК, получаемый путем водной экстракции тысячелистника благородного и очищенный перекристаллизацией в этиловом спирте, обладает способностью снижать иммуносупрессирующее действие антибиотиков и стафилококковой инфекции, что впервые экспериментально показано в официальной медицине. Авторы [2], обсуждая действие ПСК тысячелистника, сравнивают его с известным иммуномодулирующим действием ПСК, выделенного из женьшеня [3] и софоры японской [4].

Видовой эпитет не является точным переводом латинского (известно 42 вида тысячелистника!). Поэтому решением специальной комиссии в советское время ограничились словом «обыкновенный». В молдавском заповеднике «Ягорлык» различают 9 видов: испанский, благородный, Нейльрейха, пойменный, расставленный, степной, холмовой, щетинистый и паннонский. Последние два используются для корма крупного рогатого скота и лошадей.

Обыкновенный и благородный тысячелистники встречаются почти повсеместно. Лечебными свойствами обладают оба вида. Их можно различать по структуре листьев: у обыкновенного тысячелистника листья дважды перисто-рассеченные, а у благородного листья прерванно-двоякоперисто-надрезанные. Передозировка при употреблении в пищу листьев, цветков и молодых побегов может вызвать отравление, сопровождающееся головокружением и высыпанием на коже. Поэтому используют его в профилактических и/или лечебных целях сначала в небольших количествах (лучше в сборах) и с периодичностью не больше двух недель.

Проведенный нами [5] предварительный анализ микроэлементного состава некоторых лекарственных растений, фитосборов и фитохитодезов показал, что даже в одном растении содержится большой набор макро-, микро- и наноэлементов, а элементный состав одного и того же растения существенно отличается от его территориального происхождения на планете. Возможно, именно этим объясняется давно установленный фитотерапевтами и травниками факт наиболее эффективного оздоровления организма человека только в случае применения лекарственных растений, взятых именно из его среды обитания, когда не происходит существенного изменения в микроэлементном обмене. Кроме этого, подтверждена ожидаемая закономерность: чем больше компонентов в сборе лекарственных растений, тем более богатый качественный и количественный состав всех макро-, микро- и наноэлементов, что может положительно влиять на эффективность оздоровления и профилактики различных отклонений от нормального состояния организма человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали методы атомно-эмиссионной спектроскопии (ICAP-61, Thermo Jarnell Ash, США) и масс-спектропии (X-7, Thermo Elemental, США), позволяющие определять содержание всех элементов таблицы Д. И. Менделеева, за исключением германия, галоидов и элементов 8-й группы. Образцы тысячелистника обыкновенного из Калужской и Московской областей (2012) были испытаны в аналитическом сертифицированном испытательном центре ФГБУН 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уместно отметить богатый по разнообразию и количественному элементному составу тысячелистник обыкновенный (и тысячелистник благородный) [5]. В представленной таблице 1 имеются данные по содержанию некоторых элементов (мкг/г) в тысячелистнике обыкновенном различного территориального и временного происхождения для сравнительного анализа.

В третьем столбце представлены результаты испытания тысячелистника обыкновенного из Калужской и Московской областей. В следующем столбике – данные Государственного торгово-экономического института (2002 г.), далее – образцы тысячелистника из окрестности химического комбината «Стерлитамак» в пределах 2–3 км (2000 г.).

Легко обнаруживаются существенные различия по некоторым элементам. Содержание ртути, меди,

железа и натрия в образцах тысячелистника отличаются на порядки. Следовательно, сбор тысячелистника и, надо полагать, других лекарственных растений нельзя проводить в окрестностях промышленных зон! Немаловажным является и то, что данные, приведенные в книге Т. Г. Гончаровой, не соответствуют данным, полученным современным методом в 2012 г. Особенно по селену, который, по сведениям автора [1], должен присутствовать в тысячелистнике в повышенных концентрациях.

Таблица 1.

Данные по содержанию некоторых элементов в тысячелистнике обыкновенном

№/п	Элемент	Калуж. – Моск. обл., 2012 г.	Красноярский ГТЭИ, 2002 г.	Стерлитамак, 2000 г.	В книге [1], 1997 г.
1	Zn	28–19	34,8	101	0,68
2	Rb	14–16	0,1	4,7	–
3	Mg	1740–2160	1160	–	2600
4	Na	13–14	800	–	–
5	Fe	95–89	82	1609	200
6	Cu	9,6–6,2	1553	–	0,74
7	K	21950– 19157	16180	–	35900
8	Ca	7880–7150	6060	–	11800
9	Cd	0,26–0,19	0,1	–	–
10	Ni	2,6–0,9	10,7	–	0,2
11	Se	<0,05	–	–	6,25
12	Hg	<0,006	Следы	8,67	–

Современные методы позволяют определять практически все элементы таблицы Д. И. Менделеева. В таблице представлены сведения только по тем элементам, по которым можно было найти информацию в литературе и выявить существенные различия. Результаты наглядно демонстрируют необходимость постоянного контроля содержания всех элементов в растениях с указанием источника образца по времени и территории.

Примененный в работе метод не позволяет определять элемент германий (отсутствует методика выделения германия из растительного сырья). Однако элемент германий спектрально не определяется. Но

ролью его в биологических системах пренебрегать нельзя [6]. Достаточно напомнить, что герматраны обладают противоопухолевым, гипополидемическим, гипотензивным, антивирусным и антималярийным эффектами [6]. В последние годы ведутся дискуссии об эссенциальной роли германия в организме (в иммунной системе). Отметим, что, по литературным данным, германий содержится в чесноке, бобовых, корне женьшеня, грибах, алоэ, отрубях, семенах, рыбе, молоке, томатном соке.

Суточная доза – 0,8–1,6 мг. Недостаток германия приводит к развитию остеопороза и повышению риска развития онкологических заболеваний. Есть мнение: иммуномодулирующие свойства определяются наличием элемента германий. В связи с этим и данными патента, полученного в 2002 г. Курским государственным медицинским университетом [2], важно знать и о содержании элемента германия в лекарственных растениях, и в частности в тысячелистнике различного происхождения. Определение германия в растительном материале, воде, почве и воздухе возможно аналитическими методами, разработанными давно [7] или созданными в настоящее время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хочется выразить надежду, что общественность в ближайшее время сможет получить информацию о содержании элементов, включая и германий, в лекарственных растениях (и их частях) различного территориального и временного происхождения. Это обогатит фитотерапию и даст возможность более обоснованно применять различные ее методы в оздоровлении и профилактике заболеваний.

В дополнение к заключению важно сообщить следующее. Хитозан, как аминополисахарид, в основном используется в качестве катионного полиэлектролита [8]. Существенно, что этот же полимер может быть преобразован в состояние анионного полиэлектролита. Один из первых наших патентов был посвящен способу получения такого полиэлектролита без применения органических растворителей на всех стадиях синтеза, только в водных средах, что обуславливало получение особо чистого продукта [9]. Выдающийся инфекционист России, профессор Лидия Васильевна Погорельская, которая использовала в качестве компонента своих сборов и тысячелистник обыкновенный, установила, что хитозан в виде анионного полиэлектролита эффективен не только при лечении язвенных заболеваний, но и при сальмонеллезе и дизентерии, когда катионный полиэлектролит бессилен [10, 11]. Механизм этого явления не изучен. Почему так происходит, каковы границы и степень управляемости? Вопросы к микробиологам.

Исследователи [2] обнаружили важное качество ПСК, выделенного из тысячелистника благородного. Для определения действующего начала важно не только установить структуру полисахаридного комплекса, но и содержание микро- и наноэлементов, включая элемент германий (ООО «Микронутриенты»), как в исходном сырье, так и в экстрагируемом из растения веществе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Т. А. Энциклопедия лекарственных растений. Лечение травами. В 2 томах. – М: МСП, 1997. 560 и 528 с. [Goncharova T. A. Entsiklopediya lekarstvennykh rastenii. Lechenie travami. V 2 tomakh. [Encyclopedia of medicinal plants. Herbal treatment. In 2 volumes.] – М: MSP, 1997. 560 i 528 s.]
2. Патент № 2234934. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью / Чалый Г.А., Сурнина Н.Т., Яцюк В.Я., Сошникова О.В.; патентообладатель Курский гос. мед. университет. – Заявл. 28.10.2002; опубл. 27.08.2004.
3. Смолина Т. П. Иммуномодулирующее действие полисахаридов, выделенных из корня и культуры клеток женьшеня: автореф. дисс. ... к. биол. н. – Владивосток. 1994. 21 с. [Smolina T. P. Immunomoduliruyushchee deistvie polisakharidov, vydelennykh iz kornya i kul'tury kletok zhen'shenya: avtoref. diss. ... k. biol. n. [Immunomodulating effect of polysaccharides isolated from the root and culture of ginseng cells: author's abstract. diss. ... to. Biol. n.] – Vladivostok. 1994. 21 s.]
4. Горбачева Л. А. Целенаправленное фитохимическое изучение плодов софоры японской: дисс. ... к. фарм. н. – 1998. [Gorbacheva L. A. Tselenapravlennoe fitokhimicheskoe izuchenie plodov sofory yaponskoi: diss. ... k. farm. n. [Purposeful phytochemical study of Japanese Sophora fruits: diss. ... PhD.] 1998.]
5. Комаров Б. А., Трескунов К. А. Роль элементов в действующих началах лекарственного растительного сырья // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: материалы международной научно-практической конференции. 5–7 декабря 2012 г. Щелково. РАСХН ВНИТИ БП. [Komarov B. A., Treskunov K. A. Rol' elementov v deistvuyushchikh nachalakh lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya // Nauchnye osnovy proizvodstva i obespecheniya kachestva biologicheskikh preparatov dlya APK: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. [The role of elements in the active principles of medicinal plant raw materials // Scientific foundations of production and quality assurance of biological preparations for the agroindustrial complex: materials of the international scientific and practical conference.] 5–7 dekabrya 2012 g. Shchelkovo. RASKhN VNITI BP.]
6. Кудрин А. В., Скальный А. В., Жаворонков А. А., Скальная М. Г., Громова О. А. Иммунофармакология микроэлементов. – М.: КМК. 2000. С. 220 и 386. [Kudrin A. V., Skal'nyi A. V., Zhavoronkov A. A., Skal'naya M. G., Gromova O. A. Immunofarmakologiya mikroelementov. [Immunopharmacology of microelements.] – М.: КМК. 2000. S. 220 i 386.]
7. Назаренко В. А. Аналитическая химия германия. – М.: Наука, 1973. 189 с. [Nazarenko V. A. Analiticheskaya khimiya germaniya. [Analytical chemistry of germanium.] – М.: Nauka, 1973. 189 s.]
8. Патент РФ № 2215749. Способ получения водорастворимых форм хитозана / Комаров Б. А., Албулов А. И. – Заявл. 14.06.2001, опубл. 10.11.2003.
9. Патент РФ № 2144040. Способ получения натриевой соли сукцината хитозана / Комаров Б. А., Албулов А. И., Белов М. Ю., Самуйленко А. Я., Фоменко А. С., Шинкарев С. М., Трунов А. М. – Заявл. 07.04.1998, опубл. 10.01.2000.
10. Патент РФ № 2174000. Способ лечения инфекционных заболеваний / Погорельская Л. В., Трескунов К. А., Трякина И. П., Комаров Б. А., Турьянов М. Х., Петрова Е. В. – Заявл. 22.02.2000, опубл. 27.09.2001.
11. Патент РФ № 2273484. Средство для лечения инфекционных заболеваний / Погорельская Л. В., Комаров Б. А., Костенко А. А., Албулов А.И. – Заявл. 22.03.2004, опубл. 10.04.2006.

УДК 615.322

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ СОЛОДКИ

Б. В. Бровченко^{1*}, В. А. Ермакова², А. Н. Кузьменко², И. А. Самылина²,
И. И. Краснюк (мл.)²

Резюме. Проведена сравнительная оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки методами УФ-спектрофотометрии (ГФ РФ XIII) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Разработана пробоподготовка для ВЭЖХ-метода количественного определения глицирризиновой кислоты в образцах отечественного производства. Экспериментально установлена малая селективность УФ-спектрофотометрии при определении глицирризиновой кислоты и показана перспективность метода ВЭЖХ для стандартизации сырья солодки.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, сырье солодки, моноаммония глицирризинат, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), УФ-спектрофотометрия, пробоподготовка, селективность метода, количественное определение, лекарственное растительное сырье.

OPTIMIZATION OF HPLC METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID IN LICORICE ROOTS

B. V. Brovchenko^{1*}, V. A. Ermakova², A. N. Kuzmenko², I. A. Samylina², I. I. Krasnyuk (Jr.)²

Abstract. Comparative evaluation of glycyrrhizic acid content in licorice roots by methods of UV-spectrophotometry (GF RF XIII) and high-performance liquid chromatography (HPLC) was carried out. Sample preparation for HPLC method of quantitative determination of glycyrrhizic acid in samples of domestic production is developed. Small selectivity of UV-spectrophotometry at determination of glycyrrhizic acid is experimentally established and perspective of HPLC method for standardization of licorice raw materials is shown.

Keywords: glycyrrhizic acid, licorice raw materials, monoammonium glycyrrhizinate, high-performance liquid chromatography (HPLC), UV spectrophotometry, sample preparation, selectivity of the method, quantitative determination, medicinal plant raw materials.

1 – ООО «АЗТ Фарма К.Б.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

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

1 – LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

2 – Sechenov First State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальной является оптимизация методов контроля качества растительных лекарственных средств (в том числе исходного сырья), используемых для контроля серийной продукции и надежного выявления фальсификатов.

Развитие методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) расширяет возможности её использования для анализа лекарственного растительного сырья.

Солодка давно и широко используется в лечебной практике. Известна своими целебными свойствами благодаря содержащимся в её корнях тритерпеновым сапонинам, флавоноидам, глицирризиновой кислоте и другим биологически активным соединениям (БАС). Количественное содержание глицирризиновой

кислоты (ГК) согласно ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни» ГФ РФ XIII издания [1] проводится методом УФ-спектрофотометрии (не менее 6%) [2], в то время как в зарубежных фармакопеях Европейского союза, США, Китая и Японии [3–6] для стандартизации сырья солодки используется метод ВЭЖХ и содержание ГК нормируется на уровне 2–4%. Следует отметить, что в РФ используется сырье солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). За рубежом наряду с указанными видами солодки используют корни других видов, например солодки вздутой (*Glycyrrhiza inflata* Bat.)

Цель исследования

Разработать ВЭЖХ-методику для стандартизации сырья и препаратов солодки, применяемых в отечественной фармацевтической практике. Провести сравнительную оценку содержания

ГК в корнях солодки методом УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Оценить селективность метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования были взяты образцы корней солодки производства ОАО «Красногорсклексредства» (серия 141116), в качестве эталона сравнения использовался стандартный образец моноаммонийной соли кислоты глицирризиновой USP CRS (СО ГК). Исследования проводили на УФ-спектрофотометре Shimadzu UV-1800 с двухлучевой оптической схемой, спектральным диапазоном 190–1100 нм, с детектором – кремниевым фотодиодом и шириной щели 1 нм, а также на ВЭЖХ-системе Alliance, Empower 2 (Waters, США), снабженной спектрофотометрическим детектором и колонкой Luna-Omega C18, 4,6x250 мм (Phenomenex, США), заполненной полнопористым октадецилсиланом, с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и раствора 0,5% ортофосфорной кислоты в соотношении 40:60 при расходе элюента 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при 254 нм, объем вводимой пробы составлял 10 мкл.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемый объект был проанализирован фармакопейным методом УФ-спектрофотометрии по ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни». Далее изучали хроматографические характеристики стандартного образца моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (СО ГК). В ходе исследования готовили раствор СО ГК из расчета содержания ГК в корнях солодки не менее 6% в следующей концентрации: 0,0165 г стандартного образца аммония глицирризината помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл метанола, доводили до метки метанолом и перемешивали (концентрация – 660 мкг/мл). УФ-спектр раствора СО ГК не отличался от спектра испытуемого раствора (рисунок 1). Данное исследование проводили для уста-

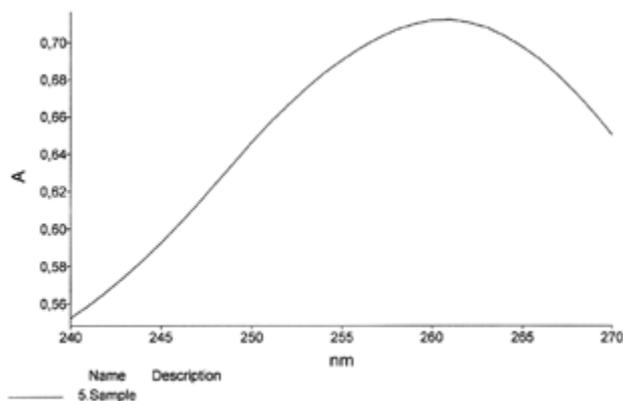


Рисунок 1. УФ-спектр раствора СО ГК

новления возможности использования метода пробоподготовки по ГФ XIII при количественном определении ГК методом ВЭЖХ. При сравнении максимумов поглощения на УФ-спектрофотометре испытуемого раствора и раствора СО ГК спектры не отличались друг от друга. Далее проводили сравнительное изучение экстракции ГК фармакопейным способом при помощи методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ с целью определения погрешности первого и возможности использования фармакопейного метода пробоподготовки для второго. В результате было установлено, что метод УФ-спектрофотометрии определяет содержание ГК на уровне 10%, а ВЭЖХ – на уровне 2%. Исследования проводили в шести повторностях. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения содержания ГК методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ

№ п/п	Навеска, г	УФ-спектрофотометрия		ВЭЖХ	
		Поглощение	Содержание ГК, %	Площадь пика, мВ·с	Содержание ГК, %
1	2,0233	0,5801	8,93	176,242	1,86
2	2,1402	0,8167	11,88	217,883	2,16
3	2,3343	0,9110	12,15	230,578	2,10
4	1,8865	0,6219	10,26	175,809	1,98
5	2,3475	0,7126	9,45	233,945	2,12
6	2,5395	1,0150	12,44	260,597	2,18
Среднее			10,85		2,06
Ст. откл.			1,50		0,12
RSD, %			13,81		5,81

Стоит отметить, что при определении содержания ГК методом ВЭЖХ в растворах, полученных фармакопейным способом пробоподготовки, на хроматограммах наблюдался дополнительный пик на 3,345 минуты, который был значительно больше пика искомого компонента (рисунок 2). На хроматограмме СО ГК дополнительного пика не наблюдалось (рисунок 3). При использовании фармакопейного способа пробоподго-

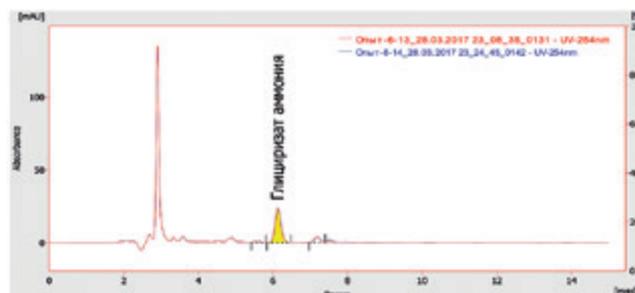


Рисунок 2. Хроматограмма испытуемого раствора

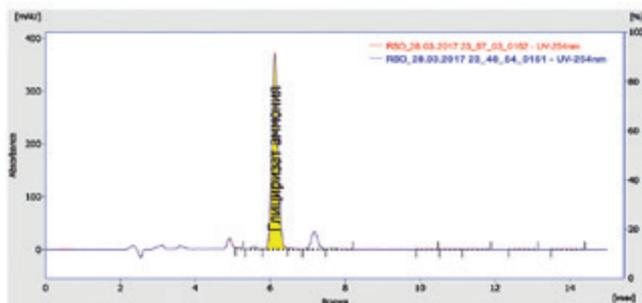


Рисунок 3. Хроматограмма раствора СО ГК

товки в процессе экстракции из корней солодки, кроме глицирризиновой кислоты, в раствор дополнительно экстрагируется сумма веществ, поглощающих в диапазоне длин волн от 250 до 270 нм.

Результаты, полученные методом УФ-спектрофотометрии, соответствуют требованию ФС.2.5.0040.15 и превышают нормированное содержание ГК в корнях солодки в 1,5–2 раза; данные ВЭЖХ дают результат в 2–3 раза меньше нормы, установленной ФС. Нужно отметить, что метод выделения моноаммонийной соли ГК, изложенный в ГФ XIII, не в полной мере полноценен и существует целый ряд исследований по его модификации [9, 10]. Для установления более точного содержания ГК в корнях солодки было принято решение применить метод ВЭЖХ, как более селективный, и на основании литературных данных подобрать способ пробоподготовки, обеспечивающий наилучшую экстракцию ГК. В ходе анализа литературных сведений [7, 8, 11] установлено, что наилучшие результаты экстрагирования были получены при использовании водно-метанольной смеси в соотношении 50:50. В приведенных литературных источниках указано, что сырьем для исследований служили корни солодки Коржинского (*Glycyrrhiza korshinskyi* Grig.), не являющейся официальным видом в РФ. Учитывая этот факт, нами при разработке методики ВЭЖХ для оценки качества сырья и препаратов солодки, разрешенных в РФ, экспериментально были подобраны условия экстракции и экстрагенты. В исследовании апробированы следующие водно-метанольные смеси: соотношение метанол : вода – 50:50; 70:30; 30:70. Экстракцию проводили при комнатной температуре на УЗ-бане дважды по 30 минут с перерывом 10 минут.

При проведении испытаний готовили по пять навесок (около 0,5 г). Для анализа точную навеску измельченных корней солодки, около 0,5 г, с размером частиц, проходящих сквозь сито 0,2 мм, помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 100 мл соответствующего растворителя, закрывали пробкой, перемешивали, маркировали в соответствии с установленным кодом раствора. Помещали в УЗ-баню и обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. По

истечении установленного времени колбу вынимали из ванны, давали раствору остыть при комнатной температуре в течение 10 минут, затем снова обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. При охлаждении растворов в перерывах между экстрагированиями воду в бане заменяли на свежую комнатной температуры. Такой подход к экстрагированию был определен в ходе анализа данных литературы, согласно которым наилучший результат был достигнут при двукратной обработке ультразвуком с перерывом для охлаждения образцов [8]. Все растворы после их соответствующей обработки отстаивали в течение 10 минут. Далее, используя автоматический дозатор вместимостью 10 мл, отбирали 5 мл испытуемого раствора из центра соответствующей конической колбы, переносили в пластиковый шприц Лурье, который был соединен с фильтрующей насадкой PVDF диаметром 15 мм и размером пор 0,45 мкм (CHROMAFIL P-45/15 MS, Macherey-Nagel, кат. № 729 044). Пробу фильтровали, отбрасывая первый миллилитр. Фильтрат использовали в хроматографическом анализе. В указанных условиях пик глицирризиновой кислоты фиксируется на хроматограмме на 6,456 минуты при эффективности 6500 ± 350 т.т. и коэффициенте асимметрии 0,85–1,0. Время хроматографирования – 15 мин. С каждым экстрагентом извлечение проводили в пяти повторностях, а хроматографирование каждой пробы проводили дважды и затем усредняли полученные результаты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как описано выше, при использовании фармакопейного способа пробоподготовки в процессе экстракции из корней солодки, кроме глицирризиновой кислоты, в раствор дополнительно экстрагируется сумма веществ, поглощающих в диапазоне длин волн от 250 до 270 нм, это дает основание считать, что метод УФ-спектрофотометрии является интегральным и дает завышенный результат совокупности экстрагированных веществ. Об этом свидетельствует и метод ВЭЖХ: на приведенных примерах хроматограмм дополнительный пик значительно больше пика искомого компонента. Подтверждением этому является достаточно большой разброс значений содержания ГК при её количественном определении в корнях солодки разными методами (таблица 1): среднее значение УФ-спектрофотометрии – 10,85% (минимум составляет 8,93%, максимум – 12,44%, разброс значений – 32%); ВЭЖХ – 2,06% (минимум составляет 1,85%, максимум – 2,19%, разброс значений – 16%).

Как уже было сказано выше, для определения наилучшей экстракции ГК были подобраны три соотношения растворителей (метанол/вода) – 50:50; 70:30; 30:70. Растворители готовили, точно отмеривая мерным цилиндром количества, приливая метанол к воде. Для проведения испытаний подготавливали по пять

навесок (около 0,5 г) и экстрагировали на УЗ-бане при описанных выше условиях. Хроматографирование по каждой навеске вели в двух повторностях, полученные данные усредняли. Данные по количественному содержанию глицирризиновой кислоты выбранным методом представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты определения ГК с использованием указанных типов экстрагентов

Метанол/ вода 70:30	Навеска, г	Содержа ние ГК, %	Метанол/ вода 50:50	Навеска, г	Содержа ние ГК, %	Метанол/ вода 30:70	Навеска, г	Содержа ние ГК, %
1	0,5117	5,02	1	0,5022	5,64	3-1	0,4980	5,54
2	0,4931	5,39	2	0,5050	5,57	3-2	0,4933	5,67
3	0,4997	5,34	3	0,5105	5,65	3-3	0,5015	5,69
4	0,4967	5,47	4	0,4912	5,62	3-4	0,4912	5,82
5	0,4997	5,52	5	0,4982	5,64	3-5	0,5086	5,81
Среднее значение		5,35			5,62			5,70
Стат. откл.		0,19			0,04			0,10
RSD, %		3,51			0,76			1,84

Как видно из таблицы, максимальное содержание ГК достигается при использовании в качестве экстрагента смеси метанол : вода в соотношении 30:70.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе разработки ВЭЖХ-методики для стандартизации сырья солодки проведена сравнительная оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки методом УФ-спектрофотометрии (ГФ XIII) и предложенным методом ВЭЖХ с использованием пробоподготовки по ГФ XIII. Установлено, что фармакопейный метод дает завышенные результаты (более 10% ГК от нормы); предложенный метод ВЭЖХ показывает содержание ГК в корнях солодки около 2%, что свидетельствует о большей селективности метода.

Ввиду сложности пробоподготовки фармакопейного метода и наличия в экстракте дополнительной суммы веществ разработана методика ВЭЖХ, в рамках которой экспериментально обоснованы оптимальные условия экстракции ГК из сырья солодки, применяемого в отечественной фармацевтической практике.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности использования метода ВЭЖХ для оценки качества сырья и препаратов солодки, а также включения его в нормативную документацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. ФС 2.5.0040.15. Солодки корни // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. – М., 2015.
2. ФС 573. Корень солодки // Государственная фармакопея СССР. X изд. – М.: Медицина, 1968.
3. The United States Pharmacopeia, USP30 NF25. 2009. V. 2. Liquorice. P. 2263.
4. European Pharmacopoeia 7th edition: Liquorice root – Liquiritiae radix 01/2011: 0277.
5. Pharmacopoeia of the people's republic of China. 2005. V. 1. P. 207–209.
6. The Japanese Pharmacopoeia, 14th ed. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan Part 2. 2002. P. 932–933.
7. Гаврилин М. В., Сенченко С. П., Тамирян А. М., Печенова А. В. Совершенствование способов оценки качества корней и сиропа солодки // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 147–150. [Gavrilin M. V., Senchenko S. P., Tamiryana A. M., Pechenova A. V. Improvement of methods for assessing the quality of licorice roots and syrup // Chemistry of plant raw materials. [Perfection of methods for assessing the quality of roots and licorice syrup // Chemistry of plant raw materials.] 2009. № 4. P. 147–150.]
8. Hennell J. R., Lee S., Khoo C. S. The determination of glycyrrhizic acid in Glycyrrhiza uralensis Fisch. ex DC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. V. 47. P. 494–500.
9. Столярова О. В., Балтина Л. А., Михайлова Л. Р. и др. Оптимизация метода получения моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты из корней солодки уральской Glycyrrhiza uralensis Fisch.) сибирских популяций // Химия в интересах устойчивого развития. 2008. Т. 16. № 5. С. 571–576. [Stolyarova O. V., Baltina L. A., Mikhailova L. R. etc. Optimization of the method of obtaining monoammonium salt of glycyrrhizic acid from the roots of the Ural licorice (Glycyrrhiza uralensis Fisch.) Siberian populations // Chemistry for sustainable development. [Optimization of the method for obtaining the monoammonium salt of glycyrrhizic acid from the roots of the licorice of the Ural Glycyrrhiza uralensis Fisch.) Of Siberian populations // Chemistry for Sustainable Development.] 2008. V. 16. № 5. P. 571–576.]
10. Wang P., Li S. F. Y., Lee H. K. Simultaneous analysis of glycyrrhizin, paeoniflorin, quercetin, ferulic acid, liquiritin, formononetin, benzoic acid and isoliquiritigenin in the Chinese proprietary medicine Xiao Yao Wan by HPLC // J. Chromatograph. A. 1998. V. 811. № 1–2. P. 219–224.
11. Кондратенко Р. М., Балтина Л. А., Михайлова Л. Р., Данилов В. Т., Габбасов Т. М., Муринов Ю. И., Толстиков Г. А. Получение глицирризиновой кислоты и ее практически важных солей из экстракта солодкового корня // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т. 39. № 2. С. 33. [Kondratenko R. M., Baltina L. A., Mikhailova L. R., Danilov V. T., Gabbasov, T. M., Murinov Y.I., Tolstikov G.A. Preparation of glycyrrhizic acid and its salts are practically important from the extract of licorice root // Chemical-pharmaceutical journal. [The preparation of glycyrrhizic acid and its practically important salts from the extract of licorice root // Khimiko-pharmaceutical magazine.] 2005. V. 39. № 2. P. 33.]

УДК 615.22

ЭМБИНИН – ПЕРСПЕКТИВНОЕ КАРДИОТОНИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Д. Ю. Ивкин^{1*}, В. Г. Лужанин¹, А. А. Карпов^{2,3}, С. М. Минасян^{2,3},
Я. И. Полеценко², А. Э. Мамедов², М. Н. Пovyдыш¹, В. В. Поройков⁴,
И. А. Наркевич¹

Резюме. Эмбинин – флавоновый С-гликозид надземной части касатика молочного-белого (*Iris lactea*). Учитывая установленное ранее для экстракта *Iris lactea* кардиотоническое действие, выявление действующего вещества, отвечающего за данный вид биологической активности, представляется актуальной задачей. Целью настоящего исследования стала оценка кардиотропного действия и токсикологического профиля эмбинина. Острую токсичность эмбинина определяли по ГОСТ 32644-2014, оценку инотропного действия эмбинина проводили в сравнении с дигоксином на модели перфузии изолированного сердца крысы по Лангендорфу, а также *in vivo* эхокардиографическим исследованием с расчётом фракции укорочения левого желудочка (ФУ) и анализом электрокардиограмм. Эмбинин в дозе 2000 мг/кг не вызывал гибели самок крыс. Вещество обладает выраженным инотропным действием. Установление выраженного кардиотонического эффекта в эксперименте и низкая токсичность, а также высокая вероятность наличия кардиопротекторного действия эмбинина, предсказанная с использованием программы PASS, позволяют рассматривать эмбинин как перспективную молекулу для дальнейших исследований при сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: касатик молочного-белый, эмбинин, инотропный эффект, ЭХО-КГ.

EMBININ IS A PERSPECTIVE CARDIOTONIC MEAN FOR NATURAL ORIGIN

D. Yu. Ivkin^{1*}, V. G. Luzhanin¹, A. A. Karpov^{2,3}, S. M. Minasyan^{2,3}, Ya. I. Poleshenko², A. E. Mamedov²,
M. N. Povydysh¹, V. V. Poroykov⁴, I. A. Narkevich¹

Abstract. Embinin is a flavone C-glycoside from the aerial part of the milky white tangent (*Iris lactea*). Cardiotonic action was established earlier for the extract of *Iris lactea*. Identification of the active substance responsible for this type of biological activity seems to be an urgent task. The purpose of this study was to evaluate the cardiotropic effect and the toxicological profile of embinin. The acute toxicity of embinin was determined in accordance with GOST 32644-2014, the inotropic effect of embinin was evaluated in comparison with digoxin in the model of perfusion of the isolated rat heart by Langendorf, and also *in vivo* by echocardiographic study with calculation of the left ventricular shortening fraction and electrocardiogram analysis. The embinin in a dose of 2000 mg/kg didn't cause the death of female rats. The substance has a pronounced inotropic effect. Establishment of a pronounced cardiotonic effect in the experiment and low toxicity, as well as a high probability of the presence of cardioprotective action of embinin, predicted using the PASS program, allow us to consider embinin as a promising molecule for further studies in cardiovascular disease.

Keywords: *Iris lactea*, embinin, inotropic effect, echocardiography.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

2 – ФГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова» Минздрава России, Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

3 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

4 – ФБГНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича», Россия, 119121, г. Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 6–8, Leo Tolstoy str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

3 – National Medical Research Center, 2, Akkuratov str., Saint-Petersburg, 197341, Russia

4 – Institute of Biomedical Chemistry, 10/8, Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Касатик молочного-белый (*Iris lactea* Pall.) – многолетнее травянистое растение из семейства ирисовые (Iridaceae Juss.), применяется в народной медицине как антигипоксическое, иммуномодулирующее и противовоспалительное средство. Лекарственным сырьем является трава, собранная во время цветения. Основными химическими компонентами травы являются ксантон мангиферин, флавоновые С-гликозиды группы эмбинина и его ацетильные производные, сверцияпонин, ориентин, гомоориентин, фенольные кислоты [1].

Ранее для экстрактов *Iris lactea* были установлены низкая токсичность (максимально удавалось вводить животным 7000 мг/кг, при этом гибели не наблюдали), антигипоксическая активность в широком диапазоне доз (0,1–700 мг/кг), антиоксидантное действие в условиях токсического гепатита, дозозависимые иммуномодулирующие свойства, в том числе интерферогенная активность. Также была установлена кардиотропная активность при профилактическом введении экстракта в дозах 70 и 350 мг/кг на модели ишемии миокарда у крыс [2]. Имеются сведения о наличии у экстракта свойств

модулятора активности печёночных ферментов [3]. Была разработана технология получения и стандартизации настойки из травы *Iris lactea* [4], на основе экстракта создан «Лактир» – противовоспалительный комплекс с иммуномодулирующей активностью, а также биологически активная добавка к пище «Витонк» для повышения иммунитета и профилактики онкологических заболеваний [5].

Эмбинин (6-(2-O-(-альфа-L-рамнопиранозил)-бета-D-глюкопиранозил)-5-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он) (рисунок 1) – флавоновый гликозид, впервые выделенный из надземной части *Iris lactea* в 80-х годах XX века на кафедре фармакогнозии Ленинградского химико-фармацевтического института (ныне СПХФУ) [6], однако несовершенство методологии не позволило получить исследуемое вещество достаточной степени чистоты и в количестве, необходимом для фармакологических исследований.

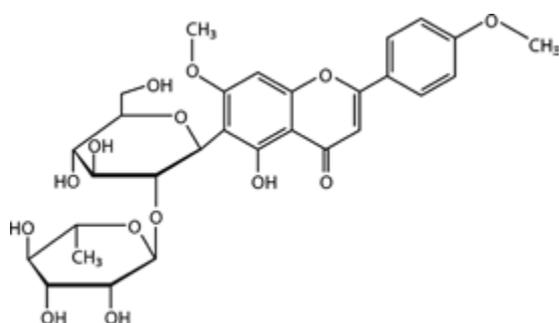


Рисунок 1. Структурная формула эмбинина

В 2016 году методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии сотрудниками СПХФУ и Университета им. Генриха Гейне (г. Дюссельдорф, Германия) был получен химически чистый эмбинин и несколько новых природных соединений – ацетилированных производных эмбинина [7, 8].

С целью определения наиболее перспективных направлений исследования биологической активности эмбинина *in vivo* использовали компьютерную программу PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). PASS позволяет по структурной формуле органического соединения оценить вероятный спектр его биологической активности, включающий фармако-терапевтические эффекты, молекулярные механизмы действия, метаболизм, влияние на генную экспрессию и транспортеры, побочные и токсические эффекты. Оценка основана на анализе взаимосвязей «структура – активность» для обширной обучающей выборки, содержащей субстанции лекарственных препаратов; «кандидаты в препараты», находящиеся на различных стадиях клинических и доклинических исследований; фармакологические вещества и биохимические реагенты; вещества, для которых имеется информация о специфической токсичности [9].

Средняя точность прогноза, рассчитанная по скользящему контролю с исключением по одному для

всех веществ обучающей выборки и всех видов биологической активности, составляет около 95%. Результаты прогноза, помимо названий активности, включают в себя оценки вероятностей наличия (Pa) и отсутствия каждой активности (Pi), имеющие значения от 0 до 1 [9]. При сопоставлении качества предсказания этой программы и ряда других методов прогноза профилей биологической активности показано наличие определенных преимуществ у PASS [10, 11].

Наиболее вероятным среди прогнозируемых для эмбинина видов биологической активности является кардиопротекторное действие (Pa=0,961, Pi=0,002) (таблица 1). Полученный результат указывает на перспективность дальнейшего тестирования данного соединения в экспериментах *in vivo* в отношении кардиотропных эффектов.

Таблица 1.

Прогнозируемый спектр активности для (6-(2-O-(-альфа-L-рамнопиранозил)-бета-D-глюкопиранозил)-5-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-она) (эмбинина). Pa>0,9

Активность	Pa	Pi
Cardioprotectant	0,961	0,002
Chemopreventive	0,954	0,002
Membrane integrity agonist	0,947	0,004
TP53 expression enhancer	0,940	0,004
Free radical scavenger	0,923	0,002
Hepatoprotectant	0,922	0,002
CDP-glycerol glycerophosphotransferase inhibitor	0,918	0,007
Anticarcinogenic	0,907	0,002
Vasoprotector	0,905	0,003
Anaphylatoxin receptor antagonist	0,905	0,004
Membrane permeability inhibitor	0,904	0,004
Cytostatic	0,900	0,004

В связи с распространенностью различных форм сердечной недостаточности, тяжелыми исходами этой патологии и недостатками существующих кардиотонических средств актуален поиск новых кардиотонических препаратов. Применение сердечных гликозидов, несмотря на их высокую эффективность, ограничивается малой широтой терапевтического действия, значительным количеством побочных явлений и противопоказаний [12]. Поиск новых негликозидных и неадренергических кардиотоников направлен на получение препаратов с большой широтой терапевтического действия и наличием дополнительных полезных при этой патологии фармакологических свойств [13].

Учитывая результаты предсказания биологической активности эмбинина с помощью компьютерной программы PASS, а также установленное ранее для экстракта *Iris lactea* кардиотоническое действие, экспериментальное исследование кардиотропной активности эмбинина представляется актуальной задачей. Таким образом, целью настоящего исследования стала оценка кардиотонического действия эмбинина и его токсикологического профиля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование острой токсичности при пероральном введении эмбинина проводили по методу определения класса острой токсичности согласно ГОСТ 32644-2014 на белых беспородных самках крыс массой 180–200 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» [14]. Животных, сгруппированных по дозам (300 и 2000 мг/кг эмбинина перорально), содержали в искусственно вентилируемых клетках при температуре 22 ± 3 °C и влажности 50–60% при искусственном освещении с 12-часовой сменой цикла «день – ночь» на полнорационном лабораторном корме с неограниченным доступом к питьевой воде. Испытание предельной дозы в 2000 мг/кг массы тела проводили на 6 животных (по 3 животных на каждый из 2 этапов). Испытуемое вещество вводили в виде суспензии в объёме до 3 мл на животное.

Оценку инотропного действия эмбинина проводили в сравнении с дигоксином на модели перфузии изолированного сердца крысы по Лангендорфу [15]. В процессе перфузии регистрировали конечное систолическое давление (КСД) в левом желудочке по стандартной методике. Модифицированный аппарат Лангендорфа состоял из двух перфузионных колонок, в одной из которых находился буферный раствор Кребса – Хенселейта, в другой – тот же раствор с растворённой в нём субстанцией эмбинина (или препаратом сравнения дигоксином). В обеих колонках осуществлялась оксигенация и термостатирование растворов при $+37$ °C.

После завершения периода стабилизации (10 мин) осуществлялось попеременное подключение перфузируемого сердца к колонкам с растворённой субстанцией эмбинина (или дигоксина) и к колонке с раствором без эмбинина (или дигоксина). Время перфузии сердца из каждой колонки составляло 1 минуту. На 30-й секунде каждого эпизода перфузии анализировалась величина КСД. На каждом сердце было выполнено 10 измерений, всего в данной экспериментальной группе было 5 сердец. Контрольная группа была аналогична опытной, в ней вместо эмбинина использовался дигоксин в эквимолярной концентрации.

Оценочным критерием инотропного эффекта субстанции эмбинина и референсного дигоксина являлся прирост величины КСД, который выражался в процентном отношении данной величины на 30-й секунде перфузии испытуемым веществом к таковой величине во время предыдущего эпизода перфузии раствором Кребса – Хенселейта без испытуемого вещества.

После исследований на изолированном сердце (органный уровень) было принято решение провести эксперимент *in vivo* для более детального изучения инотропного, хронотропного эффектов и исключения острых нежелательных лекарственных реакций на сердце. В эксперименте использовались крысы-самцы стока Wistar (n=9) массой 250 ± 50 г. Крыс наркотизировали с помощью внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 425 мг/кг (Acros Organics, США). Живот-

ные располагались на термостатируемом столике. В ходе эксперимента выполнялась запись электрокардиограммы с помощью стационарного компьютерного кардиографа высокого разрешения «Кардиотехника-8» (ЗАО «Инкарт», Россия) в стандартных отведениях с целью оценки нарушений ритма и мониторингирования частоты сердечных сокращений (ЧСС). Для оценки систолической функции сердца проводилось эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ) с расчётом фракции укорочения левого желудочка (ФУ). Использовалась эхокардиографическая ультразвуковая установка высокого разрешения MyLabTouchSL 3116 (Essaot, Италия) с сосудистым линейным датчиком (частота – 13 МГц, глубина сканирования – 2 см) [16].

На первом этапе производилась катетеризация бедренной вены и установка сосудистого катетера. Выполнялось эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ) с регистрацией основных гемодинамических показателей: ФУ и ЧСС. Расчет ФУ производился по формуле $[(\text{КДР} - \text{КСР}) / \text{КДР}] \times 100$, где КДР – конечный диастолический размер левого желудочка, КСР – конечный систолический размер левого желудочка.

В дальнейшем в бедренную вену вводилось 0,2 мл насыщенного раствора эмбинина с последующей регистрацией гемодинамических показателей непосредственно после введения, через 5 и 10 мин (рисунок 2).



Рисунок 2. Протокол эксперимента по оценке влияния эмбинина на гемодинамику *in vivo*

Результаты экспериментов обработаны статистически с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прогноз острой токсичности для крыс при пероральном способе введения, выполненный с использованием программы GUSAR [17], дает значение 527 мг/кг. Однако в результате экспериментального исследования острой токсичности было установлено, что введение эмбинина в предельной дозе 2000 мг/кг самкам крыс не вызывает гибели или каких-либо проявлений токсического действия (таблица 2), что позволяет отнести данное вещество к 5-му классу токсичности.

В то же время, по литературным данным, ЛД₅₀ препарата сравнения дигоксина для взрослых крыс составляет $30,0 \pm 1,9$ мг/кг [18], что свидетельствует о существенно большей терапевтической широте эмбинина.

Таблица 2.

Исследование по методу определения класса острой токсичности

Шаг, доза	Шаг А3, доза 300 мг/кг	Шаг А4, доза 2000 мг/кг	Шаг А4*, доза 2000 мг/кг
Исход	3 из 3 живы	3 из 3 живы	3 из 3 живы

Примечание: *повторение эксперимента.

При перфузии миокарда по методу Лангендорфа прирост систолического внутрижелудочкового давления в группе эмбинана оказался равным 19%, в группе дигоксина – 47%, различие достоверно ($p < 0,05$) (таблица 3).

Таблица 3.

Сравнительная инотропная активность эмбинана и дигоксина на выделенном миокарде

Перфузируемый раствор	Давление в левом желудочке, мм рт. ст.	
	M±m (среднее ± среднеквадратичное отклонение)	%
Кребс – Хензелейт (Контроль 1)	119±2*	100
Кребс – Хензелейт + эмбинин	142±6*	119*
Кребс – Хензелейт (Контроль 2)	112±4*	100
Кребс – Хензелейт + дигоксин	165±10*	147*

Примечание: *различия достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, положительный инотропный эффект эмбинана в сравнении с дигоксином в эквивалентной концентрации оказался менее выраженным.

В экспериментах *in vivo* сразу после введения раствора эмбинана отмечалось значимое увеличение ФУ по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$) (ФУ исходная – 43,4±3,9%; ФУ сразу после введения – 57,6±7,7%). Через 5 мин после введения отмечалась нормализация уровня ФУ (34,1±5,3%) с тенденцией ($p = 0,09$) к снижению отно-

сительно исходных показателей. Значимых различий между ФУ через 10 мин (39,6±8,1%) и исходными значениями выявлено не было ($p = 1,0$) (рисунки 3, 4).

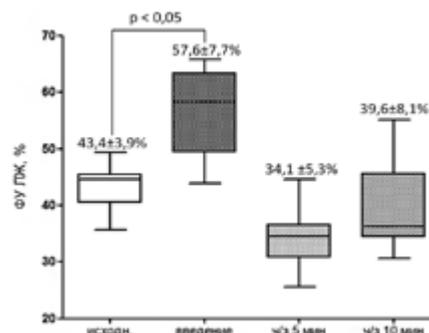


Рисунок 3. Динамика изменения фракции укорочения левого желудочка после введения эмбинана

Значимых различий по ЧСС между всеми точками наблюдения выявлено не было (исходная ЧСС – 369±7/мин, ЧСС сразу после введения – 361±14/мин, через 5 мин – 358±9/мин, через 10 мин – 359±21/мин).

На фоне введения 0,2 мл насыщенного раствора эмбинана отмечалось появление незначительного числа одиночных желудочковых экстрасистол, которые исчезали на 5–7-й минуте наблюдения.

Таким образом, в результате оценки кардиотропического действия был обнаружен положительный инотропный эффект, а также на фоне введения 0,2 мл насыщенного раствора эмбинана отмечалось появление незначительного числа одиночных желудочковых экстрасистол, которые исчезали на 5–7-й минуте наблюдения, в отличие от сердечных гликозидов, вызывающих в эксперименте аллоритмию по типу бигеминии и тригеминии [12]. Эти данные позволяют рассматривать эмбинин как перспективную молекулу для дальнейших исследований эффективности при сердечно-сосудистой патологии.

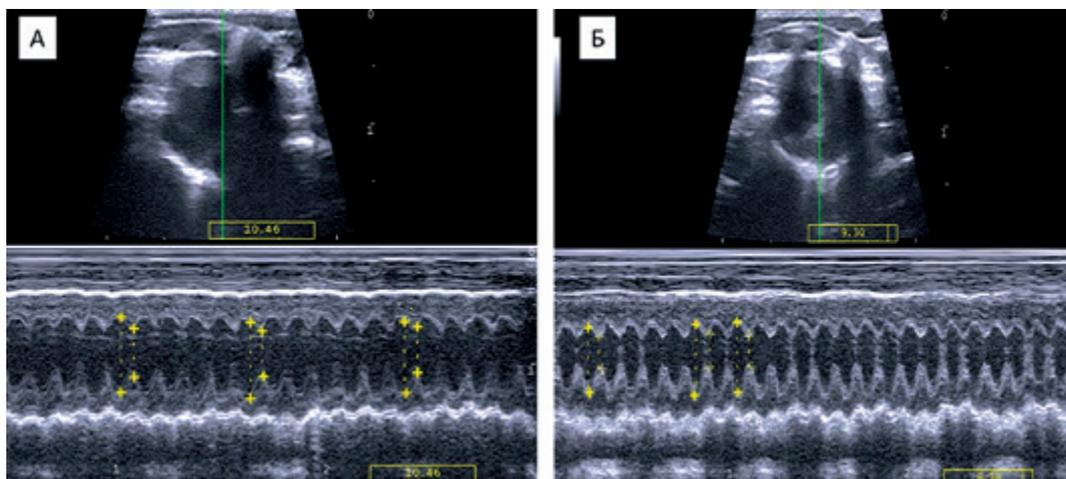


Рисунок 4. А, Б – эхокардиографическое исследование, М-режим, короткая парастернальная позиция. А – до введения эмбинана, Б – сразу после введения эмбинана

В настоящее время сердечные гликозиды в клинической медицине используют в подавляющем большинстве случаев не с целью усиления сократимости миокарда, а с целью контроля ритма и нейромуляторных эффектов (снижение катехоламинергического влияния и уровня ренина) у больных с хронической сердечной недостаточностью. В этом плане менее выраженный прирост сократимости миокарда под действием эмбинина в сравнении с дигоксином недостатком эмбинина не является. В дальнейшем планируется выполнить более детальное экспериментальное исследование механизмов инотропного действия, возможных плейотропных эффектов, оценить побочные эффекты, а также осуществить подбор эффективных доз эмбинина при сердечной недостаточности и изучить влияние его на твёрдые конечные точки при длительной терапии с целью определения возможных перспектив его клинического использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Эмбинин, флавоновый гликозид, выделенный из травы *Iris lactea*, относится к веществам 5-го класса токсичности.
2. Предсказание спектра биологической активности эмбинина с использованием программы PASS показало, что наиболее вероятным является кардиопротекторное действие.
3. В результате эксперимента на органном и организменном уровнях был обнаружен положительный инотропный эффект, что на фоне низкой токсичности позволяет рассматривать эмбинин как перспективную молекулу для дальнейших исследований при сердечно-сосудистой патологии.

Благодарности

Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности (ВВП) выполнено в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев Г. П. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений. 3-е изд. – СПб.: Спецлит, 2015. 759 с. [Yakovlev G. P. Bol'shoi enciklopedicheskiy slovar' lekarstvennykh rasteniy. 3-e izd. [The encyclopedic dictionary of medicinal plants.] 3rd ed. – SPb., Spetslit, 2015. 759 p.]
2. Мельникова Т. И. Фармакологическое изучение суммарного экстракта касатика молочного-белого: дисс. ... к.биол.н. СПб., 1994. 162 с. [Melnikova T. I. Farmakologicheskoe izuchenie summarnogo ekstrakta kasatika molochno-belogo: diss. ... k.biol.n. [The pharmacological research of the summary extract of *Iris lactea*. Dissertation of the PhD at biological sciences.] – Spb., 1994. 162 p.]
3. Friedman F. K., West D., Sugimura T., Gelboin H. V. Flavone modulators of rat hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase // *Pharmacology*. 1985. № 31. Is. 4. P. 203–2076.
4. Ланина Н. Е. Разработка технологии настойки из травы касатика молочного-белого и её стандартизация: автореф. дисс. ... к.фарм.н. – СПб., 2003. 23 с. [Lanina N. E. Razrabotka tehnologii nastoiki iz travi kasatika mo-lochno-belogo: avtoref. diss. ... k. biol. n. [The creation of tincture technology from the grass of *Iris lactea*: the author's abstract of the dissertation of the PhD at biological sciences.] – Spb., 2003. 23 p.]
5. Тихомирова Л. И., Базарнова Н. Г., Микушина И. В., Долганова З. В. Фармаколого-биохимическое обоснование практического использования некоторых представителей рода *Iris* L. (обзор) // *Химия растительного сырья*. 2015. № 3. С. 25–34. [Tikhomirova L. I., Bazarnova N. G., Mikushina I. V., Dolganova Z. V. Farmakologo-biochimicheskoe obosnovanie prakticheskogo ispol'zovaniya nekotorykh predstavitelei roda *Iris* L. (obzor) // *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. [Pharmacological and biochemical basis for the use of some species from the genus *Iris* L. (review) // *Chemistry of plant raw materials*.] 2015. № 3. P. 25–34.]
6. Пряхина Н. И. Фитохимическое изучение касатика молочного-белого: дисс. ... к.фарм.н. – СПб., 1984. 193 с. [Pryakhina N. I. Fitochimicheskoe izuchenie kasatika molochno-belogo: diss. ... k.farm.n. [Phytochemical analysis of *Iris lactea*. Dissertation of the PhD at pharmaceutical sciences.] – Spb., 1984. 193 p.]
7. Luzhanin V. G., Whaley A. K. Development of embinin isolation technology from *Iris lactea* and the research of its pharmacological activity // *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*. 2016. № 14. P. 42.
8. Whaley A. K., Ebrahim W., El-Neketi M., Ancheeva E. U., Ferhat Can Özkaya, Pryakhina N. I., Sipkina N. U., Luzhanin V.G., Liu Zhen, Peter Proksch. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea* // *Tetrahedron Letters*. 2017. V 58. Is. 22(31). P. 2171–2173.
9. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskiy D. S., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014. № 50(3). P. 444–457.
10. Druzhilovskiy D. S., Rudik A. V., Filimonov D. A., Lagunin A. A., Glorizova T. A., Poroikov V.V. Online resources for the prediction of biological activity of organic compounds // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2016. № 65(2). P. 384–393.
11. Murtazaliev K. A., Druzhilovskiy D. S., Goel R. K., Sastry G. N., Poroikov V. V. How good are publicly available web services that predict bioactivity profiles for drug repurposing? // *SAR and QSAR in Environmental Research*. 2017. № 28(10). P. 843–862.
12. Опи Л. Х. Лекарства в практике кардиолога. – М.: Рид Элсивер, 2010. С. 255–312. [Opi L.C. Lekarstva v praktike kardiologa [Medicines in the practice of a cardiologist.] – М.: Rid Elsilver, 2010. P. 255–312.]
13. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд. – М.: Новая Волна, 2005. 1200 с. [Mashkovski M.D. Lekarstvennie sredstva. 15-e izd. [Medicines. 15th ed.] – М.: Novaya Volna, 2005. 1200 p.]
14. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности. [ГОСТ 32644-2014. Metodi ispitaniya po vozdeistviyu khimicheskoy produktsii na organism cheloveka. Ostraya peroral'naya toksichnost' – metod opredeleniya klassa ostroi toksichnosti. [Methods for the testing of chemical products on the human organism. Acute oral toxicity – methods of class discription.]
15. Минасян С. М., Галагудза М. М., Сонин Д. Л., Боброва Е. А., Зверев Д. А., Королев Д. В., Дмитриев Ю. В., Васильева М. С., Григорова Ю. Н., Власов Т. Д. Методика перфузии изолированного сердца крысы // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2009. Т. 8. № 4(32). С. 54–59. [Minasyan S. M., Galagudza M. M., Sinin D. L., Bobrova E. A., Zverev D. A., Korolev D. V., Dmitriev U. V., Vasil'eva M. C., Grigorova U. N., Vlasov T. D. Metodika perfuzii izolirovannogo serdca krisi // *Regionalnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. [Methodology of isolated rat heart perfusion // *Regional blood circulation and microcirculation*.] 2009. T. 8. № 4(32). P. 54–59.]
16. Карпов А. А., Ивкин Д. Ю., Драчева А. В., Питухина Н. Н. и др. Моделирование постинфарктной сердечной недостаточности путем окклюзии левой коронарной артерии у крыс: техника и методы морфофункциональной оценки // *Биомедицина*. 2014. № 3. С. 32–48. [Karpov A. A., Ivkin D. U., Dracheva A. V., Pituchina N. N. i dr. Modelirovanie postinfarktnoi serdechnoi nedostatocnosti putem okkluzii levoi koronarnoi arterii u kris: tehnika i metodi morfofunkcional'noi ocenki // *Biomeditsina*. [Modeling of postinfarct heart deficiency using left coronary artery occlusion // *Biomedicine*.] 2014. № 3. P. 32–48.]
17. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS Prediction // *Molecular Informatics*. 2011. № 30(2-3). P. 241–250.
18. Weinhouse E, Kaplanski J, Warszawski D, Danon A, Gorodischer R. Cardiac toxicity of digoxin in newborn and adult rats // *Pediatr Pharmacol (New York)*. 1980. № 1(2). P. 97–103.

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

20
лет · years

20–23.11.2018

Россия, Москва
МВЦ «Крокус Экспо»

Crocus Expo IEC
Moscow, Russia

Международный форум
Фармтехпром

International Forum
Pharmtechprom

21–22.11.2018

Для бесплатного посещения выставки, пожалуйста,
воспользуйтесь промокодом при регистрации на сайте

To visit the exhibition for free, please use the
promo code when registering on the website

pha18pJETL

Организатор / Organised by



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

При поддержке / Supported by



pharmtech-expo.ru

УДК 615.281.8

НОВЫЙ ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ПРЕПАРАТ «ТРИАЗИД». РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Э. Г. Деева¹, Ю. И. Шевчик¹, А. А. Шалджан¹, К. А. Загородникова²,
А. А. Тумашов³, А. В. Баклыков^{3,4}, С. К. Котовская^{3,4}, О. Н. Чупахин^{3,4},
В. Н. Чарушин^{3,4}, В. Л. Русинов^{3,4}, Д. С. Копчук^{3,4*}

Резюме. В работе представлены результаты исследования фармакокинетики, переносимости и безопасности нового противогриппозного препарата «Триазид» в нескольких дозовых режимах, проведенного на здоровых добровольцах. Предложена удобная методика определения препарата «Триазид» в плазме крови и моче методом ВЭЖХ, использованная в рамках исследования. При этом не установлено достоверной статистической связи между приемом препарата, нежелательными клиническими явлениями и изменениями лабораторных показателей. Изучение фармакокинетики показало, что «Триазид» в плазме крови обнаруживается в среднем через 0,5 ч, кривая убывания концентраций двухфазна, период полувыведения в первой фазе составляет 1,5–4,0 ч. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально. С увеличением суточной дозы максимальная концентрация достигается раньше. При этом не отмечено существенной кумуляции при длительном применении. «Триазид» хорошо переносился всеми участниками во всех изученных дозовых режимах. Предпочтительными режимами, обеспечивающими поддержание эффективных и безопасных концентраций, выглядят приемы по 300 мг два и три раза в сутки.

Ключевые слова: «Триазид», грипп, клиническое исследование, безопасность, фармакокинетика.

NEW ANTIVIRAL DRUG TRIAZID. RESULTS OF FIRST PHASE OF CLINICAL TRIAL

E. G. Deyeva¹, Yu. I. Shevchik¹, A. A. Shaldghan¹, K. A. Zagorodnikova², A. A. Tumashov³, A. V. Baklykov^{3,4},
S. K. Kotovskaya^{3,4}, O. N. Chupahin^{3,4}, V. N. Charushin^{3,4}, V. L. Rusinov^{3,4}, D. S. Kopchuk^{3,4*}

Abstract. The paper contains a results of the study of the pharmacokinetics, tolerability and safety of a new influenza drug Triazide in several dose regimens conducted on healthy volunteers. The convenient method for the determining the Triazide in blood plasma and urine by the HPLC have been proposed for the using in this study. There was no reliable statistical relationship between drug intake, undesirable clinical events and changes in laboratory parameters. A study of the pharmacokinetics have been showed that Triazide in the blood plasma was found on average after 0.5 hours, the curve of decrease in concentrations was two-phase, the half-life in the first phase was 1.5–4.0 hours. The maximum concentrations with increasing dose increased in direct proportion. With an increase in the daily dose, the maximum concentration was reached earlier. At the same time, no significant cumulation was observed with prolonged use. In the study, Triazide was well tolerated by all participants in all studied dose regimens. Preferred regimens that provide maintenance of effective and safe concentrations, appearances were 300 mg two and three times a day.

Keywords: Triazide, influenza, clinical research, safety, pharmacokinetics.

1 – ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17

2 – ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова», 191015, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

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

4 – ФГАУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – Research Institute of Influenza of Ministry of healthcare of the Russian Federation, 15/17, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, 41, Kirochnaya str., Saint-Petersburg, 191015, Russia

3 – I. Ya. Postovsky Institute of organic synthesis of UB of RAS, 22, S. Kovalevskaya str. / 20, Akademicheskaya str., Yekaterinburg, 620990, Russia

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

* адресат для переписки:

E-mail: dkopchuk@mail.ru

Тел.: 8 (343) 375 45 01

ВВЕДЕНИЕ

Создание инновационных лекарственных препаратов, эффективных в отношении инфекций вирусной этиологии, является одной из наиболее актуальных задач современной медицины и фармацевтики. Это продиктовано полиэтиологичностью и контагиозностью вирусных инфекций, высокой изменчивостью вирусов и появлением новых особо опасных агентов [1]. Так, новый высокопатогенный вирус гриппа птиц H5N1, появившийся в 1997 г., вызвал беспрецедентную

смертность (до 60%) среди заболевших в странах Юго-Восточной Азии. Подобные вспышки птичьего гриппа получили достаточно широкое распространение, охватив ряд стран Европы и США [1–3]. Всемирная организация здравоохранения уже в 2000 г. декларировала необходимость подготовки к пандемии гриппа. Пандемия гриппа 2009 г., вызванная новым штаммом вируса гриппа A(H1N1), стала серьезной проблемой вследствие отсутствия выбора средств противовирусной терапии, инъекционных лекарственных форм для лечения тяжелых форм заболе-

вания, ограничения использования препаратов по причине появления резистентных штаммов [1, 4–6].

Перечисленные проблемы противовирусной терапии диктуют необходимость разработки и практического внедрения новых эффективных средств лечения гриппа [1, 6, 7]. Скрининг, проведенный среди соединений азолазинов, позволил выявить ряд наиболее перспективных соединений с высокой противовирусной активностью, в ряду которых особое место занимает препарат с условным названием «Триазид» – 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5- α]пиримидинидин I-аргининия моногидрат [8]. Согласно результатам доклинических исследований «Триазид» в системах *in vivo* обладает высокой противовирусной активностью в отношении различных штаммов вируса гриппа. «Триазид» относится к VI классу относительно безвредных веществ по классификации Hodge [9]. Полученные результаты доклинического исследования препарата «Триазид» явились основанием проведения клинического исследования I фазы для оценки переносимости, безопасности и фармакокинетики препарата и отработки режима дозирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование проводилось в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (г. Санкт-Петербург) в соответствии с этическими нормами, определенными Правилами проведения качественных клинических испытаний в РФ и Хельсинской декларацией [10–15], на основании разрешения № 250 на проведение клинического исследования от 12 апреля 2016 г., выданного Министерством здравоохранения Российской Федерации, и выписки из протокола № 120 заседания совета по этике от 01 марта 2016 г.

Пациенты

В исследование были включены здоровые добровольцы обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет, подписавшие информированное согласие. Основными критериями исключения являлись: беременность или кормление грудью; наличие острых и хронических заболеваний; сопутствующая терапия; недавнее участие в каком-либо клиническом исследовании.

Дизайн исследования

В исследовании участвовали 44 здоровых добровольца, в том числе 4 дублера, когортами по 10 добровольцев, последовательно участвовавших в случае первых трех когорт в трех этапах исследования, а в случае четвертой когорты – в двух этапах исследования.

В ходе исследования проводились следующие лабораторно-инструментальные обследования: общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи – в день скрининга и на 1, 5, 27, 34, 62 и 69-й дни исследования, ЭКГ в 12 стандартных отведениях – в день скрининга и на 33-й и 68-й дни исследо-

вания, измерение АД, ЧСС – в день скрининга и на 1–5, 27, 28, 34–38, 62, 63, 69–73-й дни исследования. Исследование включало 3 этапа: изучение фармакокинетики и переносимости при однократном приеме «Триазид»; при многократном режиме дозирования (добровольцы принимали препарат ежедневно однократно в течение 7 дней); при многократном режиме дозирования с увеличением кратности приема и суточной дозы препарата. В целом было проанализировано 11 схем приема препарата «Триазид» с эскалацией суточных доз от 300 мг до 1200 мг.

На каждый следующий этап с увеличением дозы добровольцы переходили в случае удовлетворительной переносимости и установленной безопасности на предыдущем этапе. Период «отмывания» между этапами введения препарата составлял 4 недели (5 периодов полувыведения).

Средняя продолжительность участия в исследовании для когорт I, II и III составила 73 дня, для когорты IV – 38 дней.

Забор крови для фармакокинетического анализа

При изучении фармакокинетических параметров образцы крови получали в следующие временные точки: 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72; 96 ч после приема препарата, а также изучались фоновые показатели крови (до приема препарата – точка 0). Сбор мочи проводился у добровольцев на этапе 1 в следующие интервалы времени: 0–4 ч; 4–8 ч; 8–12 ч; 12–24 ч. В каждый из указанных промежутков времени регистрировался объем мочи. Таким образом, забор проб для фармакокинетики проводился следующим образом: на 1 этапе – кровь и моча, на 2 и 3 этапах – только кровь. В качестве антикоагулянта при этом использовался гепарин (3%), 1 часть на 20 частей крови; выполнялось центрифугирование (3000 об/мин в течение 20 мин); заморозка не использовалась.

Препарат

Препарат «Триазид», капсулы, 300 мг, выпущен ОАО «Фармстандарт-Лексредства» (Россия).

Изучение безопасности и переносимости

Основными показателями безопасности и переносимости являлись: частота возникновения и тип нежелательных явлений, их тяжесть и связь с приемом препарата, динамика лабораторных и инструментальных показателей.

Изучение фармакокинетических параметров

Пробоподготовка образцов производилась в результате их обработки водным раствором соляной кислоты, дальнейшая экстракция «Триазид» производилась этилацетатом; растворитель был отогнан, а

остаток растворен в буферном растворе, используемом для проведения количественного анализа.

Содержание «Тризида» определяли в плазме крови и моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматографический анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с использованием хроматографической колонки Phenomenex Luna C18 (2), 150×2,00 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), и предколонке Eclipse XDB-C18, 4,6×12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США), при температуре 28 °С. В качестве подвижной фазы использовали смесь 50 мМ фосфатный буферный раствор (рН 4,67) : ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США), доля ацетонитрила – от 5% на старте до 20% на 7-й мин. Время хроматографирования составляло 18 мин. УФ-детектирование проводили при длине волны 210±1,2 нм. Время удерживания «Тризида» составило около 8,8 мин. Валидация данной методики была выполнена согласно ОФС.1.1.0012.15 в диапазоне концентраций от 0,03 до 20 мкг/мл.

В ходе исследования оценивались следующие фармакокинетические параметры: максимальная концентрация (C_{max}); время достижения максимальной концентрации (T_{max}); константа элиминации (k_{el}); период полувыведения ($T_{1/2}$); площадь под кривой концентраций за время наблюдения (AUC_{0-t}); площадь под кривой концентраций, экстраполированная до бесконечного времени ($AUC_{0-\infty}$); минимальная концентрация (C_{min}); фактор кумуляции (f_c); фракция, выводимая в неизменном виде (f_e); почечный клиренс (CL_R).



Agilent Technologies 1200

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с использованием непараметрических и параметрических методов.

Для статистического анализа результатов принят уровень значимости 5% и мощность используемых критериев 80%. Описательная статистика измеряемых показателей содержит следующие значения: минимальные и максимальные значения, среднее, медиана, межквартильный размах.

Оценка клинико-лабораторных показателей внутри и между когортами на всех этапах исследования проведена с помощью критерия Краскелла – Уоллиса или критерия Фридмана с соответствующими апостериорными критериями. Категориальные данные описаны с помощью процентных соотношений и абсолютных значений. Сравнение категориальных данных проводилось с помощью точного критерия Фишера. Анализ выполнен с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics, ver. 21.0 (IBM Corporation, США).

Для анализа фармакокинетических параметров использовались методы линейной и нелинейной регрессии, анализа интегральных моментов, параметрических и непараметрических анализов парных и непарных наблюдений соответственно характеру данных. Анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Statistica, Excell и GraphPad Prizm. Были представлены статистические характеристики максимальных, минимальных и средних величин с указанием интервала стандартной ошибки или процентов в зависимости от характера данных. Принимаемый уровень вероятности для отвержения нулевой гипотезы установлен при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы проведена оценка переносимости, безопасности и фармакокинетики препарата «Триазид» при использовании 11 схем приема препарата с эскалацией суточных доз от 300 мг до 1200 мг. Режим дозирования препарата составил 1, 2 и 3 раза в сутки.

Безопасность

В ходе проведенного исследования установлена безопасность и хорошая переносимость препарата «Триазид».

Средние суммарные дозы на добровольца составили: в когорте I – 6600 мг, в когорте II – 11100 мг, в когорте III – 15600 мг, в когорте IV – 9600 мг. Все когорты добровольцев получали «Триазид» в нарастающих дозировках (максимальная разовая доза – 1200 мг, максимальная суточная доза – 1200 мг, максимальная курсовая доза – 8400 мг). При этом не установлено достоверной статистической связи между приемом

препарата, нежелательными клиническими явлениями и изменениями лабораторных показателей. В ходе исследования было отмечено 53 клинических нежелательных явления, из которых 25 нежелательных явлений зафиксированы в когорте I, 13 – в когорте II, 9 – в когорте III, 6 – в когорте IV. Все нежелательные явления были легкой степени тяжести, носили транзиторный характер и не требовали отмены препарата или проведения дополнительной терапии. В процессе исследования не было зафиксировано ни одного серьезно нежелательного явления.

Среди зафиксированных нежелательных явлений (НЯ) таковые с возможной/вероятной связью с приемом препарата распределились по когортам следующим образом: в когорте I – 15 НЯ с возможной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=25$); в когорте II – 6 НЯ с вероятной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=13$); в когорте III – 4 НЯ с возможной/вероятной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=9$); в когорте IV – 1 НЯ с возможной связью с приемом препарата ($n_{\text{общее}}=6$).

При этом необходимо отметить, что связи нежелательных явлений с увеличением дозы препарата не выявлено. Наибольшее количество случаев нежелательных явлений отмечено в когорте I, где доза препарата при всех трех схемах введения была минимальной.

Таким образом, за все время проведения исследования нежелательные явления по причинно-следственной связи с приемом препарата распределены следующим образом: вероятная связь ($n=8$), возможная связь ($n=18$), сомнительная связь ($n=18$), не связанные с приемом препарата ($n=9$).

Все нежелательные явления можно разделить на следующие группы: гастроинтестинальные ($n=23$), респираторные ($n=4$), неврологические ($n=23$), кожные ($n=1$), сердечно-сосудистые ($n=1$), другие ($n=1$).

Среди нежелательных клинических явлений были отмечены: головная боль ($n=21$), боли в животе ($n=10$), диарея (неоформленный стул до двух раз в сутки) ($n=5$), тошнота ($n=3$), потеря аппетита ($n=3$), слабость ($n=2$), заложенность в ушах ($n=1$), сердцебиение ($n=1$), чувство жажды ($n=1$), метеоризм ($n=1$), кожный зуд ($n=1$), катаральные явления (заложенность носа, насморк, боли в горле) ($n=4$).

Статистически значимых различий между количеством нежелательных явлений, дозами и схемами приема препарата выявлено не было (для нежелательных явлений с вероятной связью двусторонняя значимость точного критерия Фишера составляет $p>0,999$, с возможной связью – $p=0,392$).

Таким образом, частота и характер нежелательных явлений не имели значимых различий в зависимости от когорт, схем применения и дозировок препарата.

Изучение изменений лабораторных показателей в разных когортах и при сравнении когорт между собой не позволило установить определенных тенденций. Колебания величин лабораторных показателей не выходили за пределы физиологических норм ни в одной из 11 испытанных схем применения препарата.

Анализ совокупности данных показал, что «Триазид» не вызывал каких-либо изменений общеклинического статуса добровольцев, не нарушал функциональной активности систем организма, не оказывал негативного влияния на оцениваемые параметры (ЭКГ, АД, ЧСС, температура тела).

Таким образом, применение препарата «Триазид» не оказывало патологического влияния на состояние жизнеобеспечивающих органов и систем организма, было безопасно и хорошо переносилось всеми участниками исследования.

Фармакокинетические параметры при однократном приеме препарата

С целью определения концентрации препарата «Триазид» в плазме крови и моче в рамках работы была предложена эффективная методика его количественного определения методом ВЭЖХ, которая и использовалась во всех дальнейших случаях.

Кривая убывания концентраций «Триазида» после приема однократной дозы 300 мг была нелинейной и характеризовалась двумя фазами убывания. Период полувыведения в 1-й фазе составлял 4,3 ч, во второй – 14 ч. Максимальные значения концентрации регистрировались в среднем через 4 ч и составляли 0,07 мкг/мл (медиана). В половине случаев наблюдался второй равноценный пик концентраций в интервале 12–72 ч, с медианным значением 0,09 (от 0,06 до 0,2) мкг/мл. Усредненная кривая представлена на рисунке 1А.

Среднее время удерживания составило 39 ч. Начальная фаза абсорбции была быстрой, коэффициент в несколько раз превышал соответствующий коэффициент фазы элиминации, однако затем всасывание, вероятно, замедлялось, уравниваясь со скоростью элиминации. Общий плазменный клиренс составил в среднем 219 л/ч, что подтверждает преобладание элиминации над всасыванием. Соответственно, значение кажущегося объема распределения также в среднем составило 4379 л.

При приеме «Триазида» в дозе 600 мг (рисунок 1Б) максимальная концентрация возросла пропорционально увеличению дозы, но достигалась несколько раньше, при этом одновременно увеличивалась скорость убывания концентраций в 1-й фазе, тогда как во второй она оставалась в целом неизменной. Пропорционально дозе увеличивалось и значение площади под кривой. Клиренс и кажущийся объем распределения примерно не изменялись.

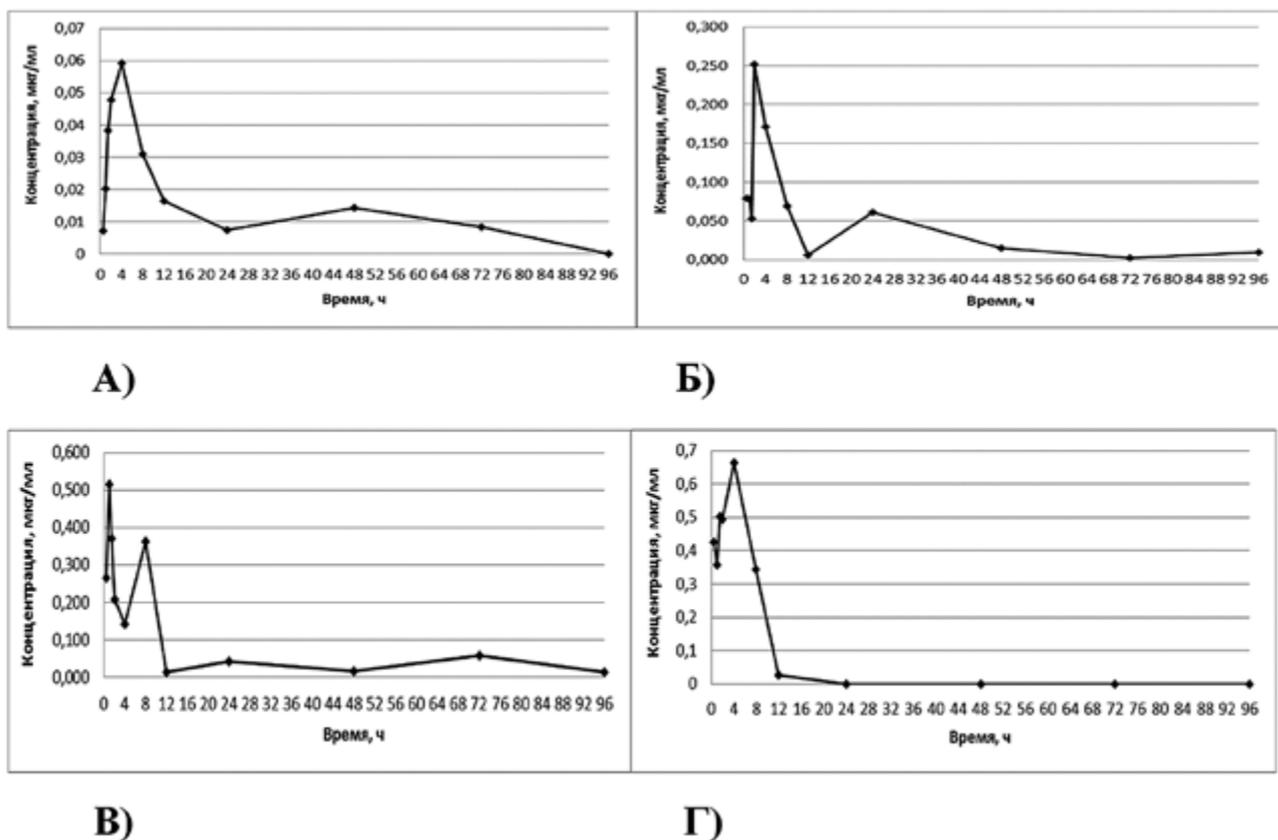


Рисунок 1. Кривые убывания концентраций «Триазид» после приема однократных доз: А) 300 мг, Б) 600 мг, В) 900 мг, Г) 1200 мг

При увеличении однократной дозы «Триазид» до 900 мг (рисунок 1В) оба пика концентраций сдвигались во времени к началу. Максимум концентраций, так же как значения площади под кривой, увеличивались пропорционально дозе. Коэффициент элиминации на хвосте распределения не изменялся, незначительно уменьшались значения плазменного клиренса и кажущегося объема распределения.

При увеличении разовой дозы до 1200 мг начальная фаза абсорбции максимально сокращалась, средний максимум концентраций наблюдался около 3 ч, максимальное значение увеличивалось пропорционально дозе (рисунок 1Г). Вторая фаза убывания нивелировалась: период полувыведения и среднее время удерживания уменьшались до значений 1-й фазы, соответственно уменьшались значения площади под кривой. В таблице 1 представлены данные показателей фармакокинетики «Триазид» при приеме однократной дозы препарата.

Оценка клиренса

С мочой при приеме препарата «Триазид» в дозе 300 мг в течение 24 ч в неизменном виде выделялось от 9 до 26% принятой дозы, в среднем 16%. Соответственно почечный клиренс составил в среднем (медиана) 63 л/ч. При увеличении дозы препарата до 600 мг

количество выведенного в неизменном виде с мочой «Триазид» варьировало от 11 до 32% (в среднем 23%). Основная часть, как и при приеме 300 мг, выводилась в интервале 4-8 ч. При приеме 900 мг однократно процент выводимого с мочой вещества несколько увеличивался (8-55%, в среднем 32%). Необходимо отметить, что при увеличении дозы до 1200 мг общее количество выведенного с мочой «Триазид» не увеличилось, что подтверждает предположение о лимитировании всасывания в этой дозе. На рисунке 2 представлена динамика выделения «Триазид» с мочой при приеме однократной дозы во всех когортах.

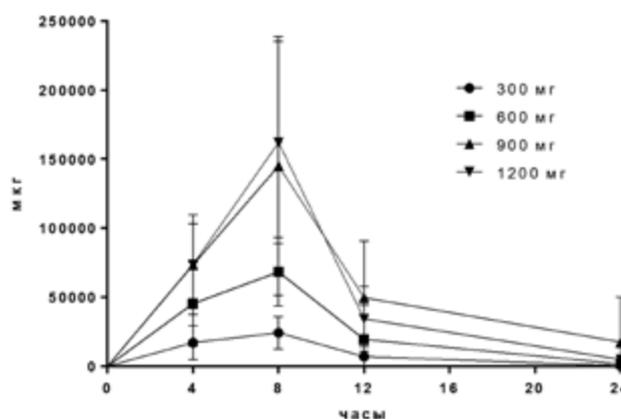


Рисунок 2. Динамика выделения «Триазид» с мочой

Таблица 1.

Данные показателей фармакокинетики «Тризида» при приеме однократной дозы препарата (при отсутствии стандартного отклонения указана медиана)

Показатель	300 мг		600 мг		900 мг		1200 мг		Достоверность различий ¹ p
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	
T _{max} (ч)	4	2,7	3	1	1**	0,5	1,25	–	0,005
C _{max} (мкг/мл)	0,1	0,06	0,3	0,26	0,59	0,4	0,77	0,5	<0,0001
(k _{el}) ₁ (ч ⁻¹)	0,16	–	0,43	–	0,31	–	0,42	–	
(T _{1/2}) ₁ (ч)	4,3	–	1,6	–	2,2	–	1,7	–	
(k _{el}) ₂ (ч ⁻¹)	0,05	–	0,06	–	0,06	–	–	–	
(T _{1/2}) ₂ (ч)	14	–	11,6	–	11,6	–	–	–	
AUC _{0-t} (мкг·ч/мл)	1,2* ¹	1	2,88*	3,4	5,41 ¹	4,1	4,70	1,4	0,007
AUC _{0-∞} (мкг·ч/мл)	1,37	0,1	2,92	3	5,48	4,1	4,70	1,4	
AUMC _{0-t} (мкг·ч ² /мл)	37,4	53	65,1	102	167	228,1	23,11	7,4	>0,05
AUMC _{0-∞} (мкг·ч ² /мл)	53,5	39	68,9	108	172	228,5	23,11	7,4	>0,05
MRT (ч)	39	21	23,6	18	22	22,3	4,5	1,76	0,07
f _e	0,16**	0,06	0,23	0,06	0,32**	0,12	0,23	0,06	0,005
CL _R (л/ч)	62	–	89	–	105	–	59	–	>0,05
Cl/F (доза/AUC) (л/ч)	219	138	205	825,9	177,4	442	251	102	>0,05
V _{d/F} (CL/k _{el}) (л)	4379	2319	3425**	6560	2359	–	634**	314	0,0005
K _a (ч ⁻¹)	0,72**	0,4	1 ¹	0,2	2,8** ¹	1,5	2,3	5	0,006
V _{ss} =CL·MRT (л)	8540**	6435	4848	10233	4109 ¹	2749	1194** ¹	639	0,004

Примечание: ¹сравнения проведены методом Kruskal – Wallis с коррекцией Dunn.

**Пары статистически достоверных различий.

Фармакокинетические параметры при многократном и длительном приеме

При многократном введении в дозе 300 мг в сутки «Тризид» кумулировал (рисунок 3), среднее значение фактора кумуляции составило 5,3 (от 1,2 до 7,5). Максимальная концентрация была в 6 раз выше, чем при однократном приеме, и достигалась раньше. Несколько ускорялось убывание в первой фазе. Значение плазменного клиренса достоверно снижалось.

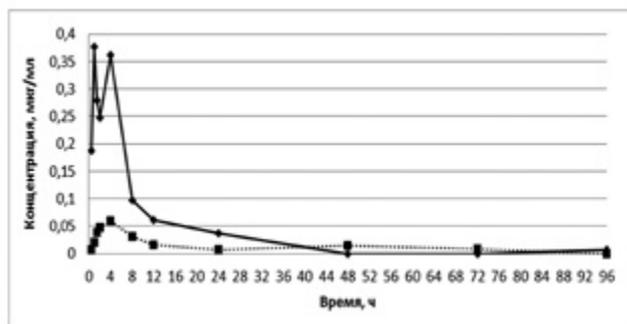


Рисунок 3. Кривые убывания концентраций «Тризида» при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 300 мг

При многократном приеме «Тризида» в дозе 600 мг 1 раз в сутки площадь под фармакокинетической кривой также незначительно увеличивалась

(рисунок 4). Медиана значения фактора кумуляции составила 1,7 (от 0,24 до 8,9). Максимальные значения достигались дважды, как и в случае однократного приема, но происходило это раньше: в первый раз – через 0,5–1,5 ч после введения, во второй – через 4–8 ч. Значения C_{max}, а также других показателей фармакокинетики значимо не изменялись. В целом, как и для дозы 300 мг, отмечался сдвиг обоих пиков концентраций влево и, как следствие, сокращение общего времени удержания «Тризида» в организме.

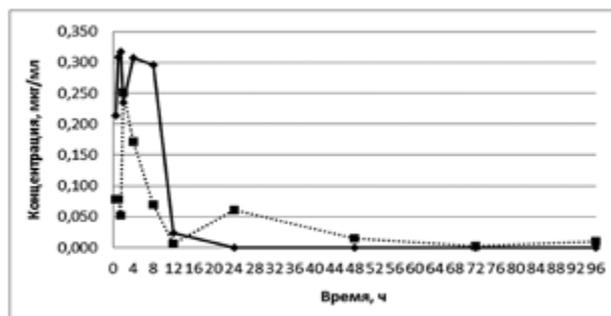


Рисунок 4. Кривые убывания концентраций «Тризида» при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 600 мг

При приеме 600 мг «Тризида» (по 300 мг два раза в день) достигались такие же максимальные концентрации, как и при его приеме в дозе 600 мг один раз в

сутки (рисунок 5). Второй пик концентраций достигался раньше (в среднем через 4 ч). Вторая фаза убывания концентраций практически не наблюдалась, период полувыведения в среднем составил 1,2 ч, что совпадало с соответствующим значением при приеме «Триазид» в дозе 600 мг один раз в сутки и длительном его приеме в дозе 300 мг. Площади под фармакокинетической кривой были существенно ниже, чем при приеме 600 мг один раз в сутки. При этом скорость элиминации «Триазид» из плазмы существенно не изменялась, не наблюдалось кумуляции, напротив, C_{max} были снижены по сравнению с многократным приемом 1 раз в сутки.

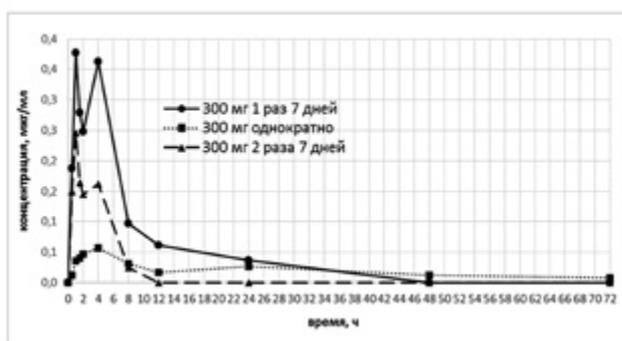


Рисунок 5. Кривые убывания концентраций «Триазид» при приеме в дозе 300 мг однократно, 300 мг 1 раз в сутки 7 дней и 300 мг 2 раза в сутки 7 дней

При длительном приеме «Триазид» в дозе 900 мг в сутки значения максимальной концентрации и время ее достижения значимо не изменялись (рисунок 6). Вторая фаза элиминации нивелировалась, первая характеризовалась такой же константой, как и при однократном приеме. Площадь под фармакокинетической кривой имела тенденцию к снижению, в основном за счет отсутствия повторного появления «Триазид» в крови через 11–12 ч (второй пик концентраций).

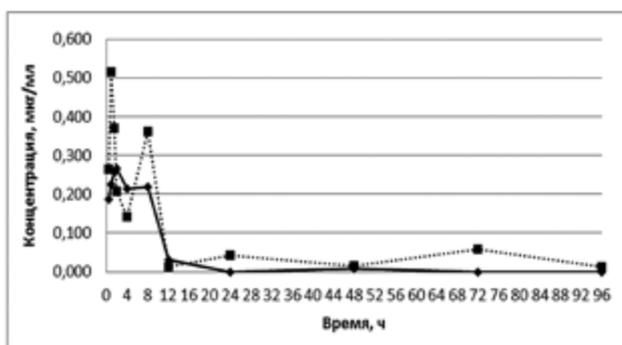


Рисунок 6. Кривые убывания концентраций «Триазид» при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 900 мг

При дозировании 900 мг «Триазид» в три приема по 300 мг кривая концентраций после каждого приема характеризовалась такими же значениями T_{max} ,

C_{max} и AUC, как после ежедневного приема препарата в дозе 900 мг один раз в сутки. Однако благодаря подобным подъемам концентраций 3 раза в сутки представляется, что этот режим обеспечивает наиболее стабильные концентрации препарата в крови в течение наиболее продолжительного времени без кумуляции (рисунок 7).

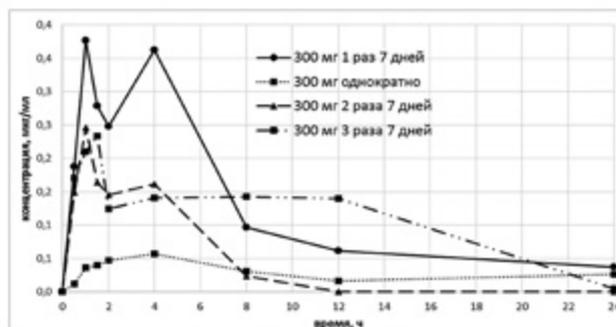


Рисунок 7. Кривые убывания концентраций «Триазид» в разных режимах приема дозы 300 мг

При длительном приеме «Триазид» в дозе 1200 мг в сутки значения максимальной концентрации и время ее достижения значимо не изменялись (рисунок 8).

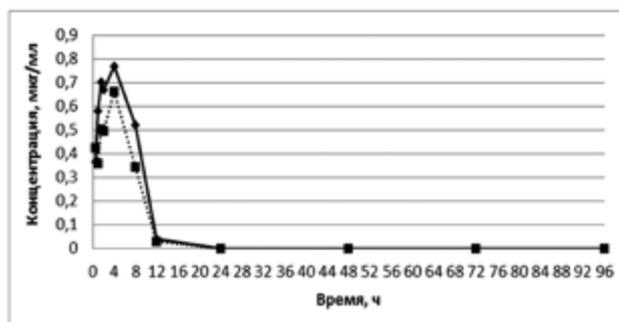


Рисунок 8. Кривые убывания концентраций «Триазид» при однократном (прерывистая линия) и многократном (сплошная линия) приеме в дозе 1200 мг в сутки

Таким образом, по сравнению с данными, полученными при однократном приеме «Триазид» в дозах 300, 600, 900 и 1200 мг, при многократном приеме в тех же дозах исчезали различия во времени достижения и величине максимальной концентрации, а также в значениях площади под фармакокинетической кривой и среднего времени удержания (таблицы 2, 3). Рассчитанный фактор кумуляции отмечен только для дозы 300 мг, в остальных дозах кумуляции практически не наблюдалось. Минимальным в дозе 300 мг был общий плазменный клиренс «Триазид», тогда как при более высоких дозах его значения значимо не различались. Отмечалась тенденция к снижению скорости всасывания при длительном приеме и при увеличении дозы, выраженной в значении константы абсорбции, однако статистической значимости эти различия не достигли.

Таблица 2.

Сводные результаты показателей фармакокинетики «Триазид» при приеме внутрь в течение недели (в отсутствие стандартного отклонения указана медиана)

Показатель	300 мг		600 мг		900 мг		1200 мг		Достоверность различий ¹ p
	Среднее/медиана	Ст. откл.							
T _{max} (ч)	1	1	1	0,4	1	0,5	1	0,4	>0,05
C _{max} (мкг/мл)	0,45	0,23	0,4	0,3	0,41	0,3	0,79	0,43	>0,05
(k _{el}) ₁ (ч ⁻¹)	0,4	-	0,6	-	0,35	-	0,6	--	>0,05
(T _{1/2}) ₁ (ч)	1,7	-	1,2	-	2,2	-	1,5	0,8	>0,05
(k _{el}) ₂ (ч ⁻¹)	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
(T _{1/2}) ₂ (ч)	13,9	-	-	-	-	-	-	-	-
AUC _{0-t} (мкг·ч/мл)	4,7	1,4	3	1,7	2,5	1	6,3	3,8	>0,05
AUC _{0-∞} (мкг·ч/мл)	3,5	-	3	1,7	2,5	1	6,3	3,8	>0,05
AUMC _{0-t} (мкг·ч ² /мл)	23	7,3	16	11	22	20	31,4	20,7	>0,05
AUCM _{0-∞} (мкг·ч ² /мл)	54	-	16	11	22	20	31,4	20,7	>0,05
MRT (ч)	4,5	1,7	5,7	1,5	7,8	4	4,5	1,76	>0,05
f _c	5,3*	-	1,7	-	0,92*	-	1	-	0,0095*
Cl/F (доза/AUC) (л/ч)	68***	25	203	-	402	146	202	96	<0,0001
V _{d/F} (CL/k _{el}) (л)	1714	-	297	-	862	619	441	222	-
K _a (ч ⁻¹)	2,3	5	0,3	0,2	0,6	0,8	0,35	0,3	>0,05

Таблица 3.

Сводные результаты показателей фармакокинетики «Триазид» при приеме внутрь однократно и в течение недели

Показатель	300 мг		600 мг		900 мг		1200 мг	
	1 день	7 дней	1 день	7 дней	1 день	7 дней	1 день	7 дней
T _{max} (ч)	4	1	3	1	1	1	1,25	1
C _{max} (мкг/мл)	0,1	0,45	0,3	0,4	0,59	0,41	0,77	0,79
(k _{el}) ₁ (ч ⁻¹)	0,16	0,4	0,43	0,6	0,31	0,35	0,42	0,6
(T _{1/2}) ₁ (ч)	4,3	1,7	1,6	1,2	2,2	2,2	1,7	1,5
(k _{el}) ₂ (ч ⁻¹)	0,05	0,05	0,06	-	0,06	-	-	-
(T _{1/2}) ₂ (ч)	14	13,9	11,6	-	11,6	-	-	-
AUC _{0-t} (мкг·ч/мл)	1,2	4,7	2,88	3	5,41	2,5	4,70	6,3
AUC _{0-∞} (мкг·ч/мл)	1,37	3,5	2,92	3	5,48	2,5	4,70	6,3
AUMC _{0-t} (мкг·ч ² /мл)	37,4	23	65,1	16	167	22	23,11	31,4
AUCM _{0-∞} (мкг·ч ² /мл)	53,5	54	68,9	16	172	22	23,11	31,4
MRT (ч)	39	4,5	23,6	5,7	22	7,8	4,5	4,5
Cl/F (доза/AUC) (л/ч)	219	63	205	203	177,4	402	251	202
V _{d/F} (CL/k _{el}) (л)	4379	1714	3425	297	2359	862	634	441
K _a (ч ⁻¹)	0,72	2,3	1	0,3	2,8	0,6	2,3	0,35

Обсуждение полученных результатов

При анализе фармакокинетических параметров было показано, что при приеме внутрь «Триазид» быстро всасывается и обнаруживается в крови уже через 0,5 ч. Нарастание концентраций происходит ступенчато благодаря одновременному течению с разной скоростью процессов всасывания, распределения в тканях и выведения. В связи с этим отмечается несколько пиков концентраций. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально и составляют в среднем 0,1 мкг/мл в дозе 300 мг, 0,3 мкг/мл в дозе 600 мг, 0,6 мкг/мл в дозе 900 мг и 0,8 мкг/мл в дозе 1200 мг. С увеличением су-

точной дозы максимальная концентрация достигается раньше. Так, при однократном приеме 300 мг «Триазид» время достижения максимальной концентрации составляет в среднем 4 ч, при длительном приеме – 1 ч. При применении доз 900 и 1200 мг были получены аналогичные данные. Убывание концентраций в плазме носит двухфазный характер, в первой фазе период полувыведения составляет от 1,5 до 4 ч, во второй – 11–13 ч. Сразу после появления в плазме «Триазид» интенсивно выводится почками в неизменном виде в среднем в количестве 30% независимо от доз. Относительное уменьшение выведения отмечается после приема 1200 мг «Триазид». Большая часть препарата выводится в интервале 4–8 ч.

При длительном применении в дозах 300 и 600 мг наблюдается некоторое увеличение площади под кривой (коэффициент кумуляции 5 и 1,7 соответственно), в дозах 900 и 1200 мг нарастания значения AUC (кумуляции) не отмечается. Коэффициент абсорбции при длительном применении снижается, говоря о замедлении всасывания. Также при длительном приеме не регистрировалась вторая фаза элиминации и общий период полувыведения составлял в среднем 1,5–2 ч во всех дозах. Благодаря этому прием «Триазид» несколько раз в сутки не приводил к кумуляции, но обеспечивал более длительное нахождение вещества в плазме. Клиренс и кажущиеся объемы распределения были значительными независимо от дозы.

В целом полученные данные говорят о лимитировании нарастания концентраций с увеличением дозы при длительном приеме, что делает в случае кратности приема более 1 раза целесообразным получение препарата в дозе не выше 600 мг. Из числа кратных режимов введения наиболее стабильные концентрации создают режимы приема 300 мг 3 раза в сутки и 300 мг 2 раза в сутки. Таким образом, для дальнейших исследований именно эти режимы представляются наиболее целесообразными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования были изучены фармакокинетика, переносимость и безопасность нового противогриппозного препарата «Триазид» в различных дозовых режимах; была предложена удобная методика определения препарата «Триазид» в плазме крови и моче методом ВЭЖХ, использованная в рамках работы. При этом установлена безопасная и хорошая переносимость препарата, а изучение его фармакокинетики показало, что после приема внутрь «Триазид» быстро всасывается и обнаруживается в крови уже через 0,5 ч. Максимальные концентрации с увеличением дозы возрастают прямо пропорционально. С увеличением суточной дозы максимальная концентрация достигается раньше. Убывание концентраций в плазме носит двухфазный характер, в первой фазе период полувыведения составляет от 1,5 до 4 ч, во второй – 11–13 ч. Анализ различных режимов приема «Триазид» показывает, что из числа кратных режимов введения наиболее стабильные концентрации создают режимы приема 300 мг 3 раза в сутки и 300 мг 2 раза в сутки.

Результаты проведенного клинического исследования I фазы по протоколу «Исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата «Триазид» при применении у здоровых добровольцев, I фаза» позволяют рекомендовать данный препарат к испытанию II фазы по оценке безопасности и эффективности.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант № 4.6351.2017/8.9).

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев О. И. Пандемии начала XXI века. Грипп птиц и пандемия «свиного» гриппа H1N1 2009 года. – СПб.: Фолиант, 2016. 368 с. [Kiselev O. I. Pandemii nachala XXI veka. Gripp ptic i pandemiya "svinogo" grippa H1N1 2009 goda. [Avian influenza and pandemic of "swine" influenza H1N1 of 2009 year.] – SPb.: Foliant, 2016. 368 p.]
2. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф: Сб. статей / Под ред. акад. РАМН Покровского В. И. и др. – СПб.: Росток, 2012. 304 с. [Gripp ptic: proiskhozhdenie infekcionnykh katastrof: Sb. statey / Pod red. akad. RAMN Pokrovskogo V. I. i dr. [Avian influenza: the origin of infectious catastrophes: Sat. articles / Ed. Pokrovsky V.I. et al.] – SPb.: Rostok, 2012. 304 p.]
3. Ligon B. L. Avian influenza virus H5N1: a review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic // Semin. Pediatr. Infect. Dis. 2005. V. 16. P. 326.
4. Reddy D. Responding to pandemic (H1N1) 2009 influenza: the role of oseltamivir // J. Antimicrob. Chemother. 2010. V. 65. P. ii35.
5. Update: Drug Susceptibility of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Viruses // JAMA. 2009. V. 301. P. 2086.
6. Киселев О. И. Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб.: Росток, 2012. 272 с. [Kiselev O. I. Khimioterapiya i khimioterapiya grippa. [Chemodrugs and chemotherapy for influenza.] – SPb.: Rostok, 2012. 272 p.]
7. Деева Э. Г. Грипп. На пороге пандемии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 208 с. [Deeva E. G. Gripp: na poroge pandemii. [Influenza. On the eve of a pandemic.] – M.: GEOTAR-Media, 2008. 208 p.]
8. Патент RU 2529487. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-a]пиримидинид л-аргининия моногидрат / Чупахин О. Н., Чарушин В. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Котовская С. К., Киселев О. И., Деева Э. Г., Саватеев К. В., Борисов С. С.; патентообладатель ИОС УрО РАН. – Заявл. 15.04.13; опубл. 27.09.14. [Patent RU 2529487. 5-Metil-6-nitro-7-okso-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinid l-argininiya monogidrat. [Patent RU 2529487. 5-Methyl-6-nitro-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidinide l-arginine monohydrate] / Chupakhin O. N., Charushin V. N., Rusinov V. L., Ulomsky E. N., Kotovskaya S. K., Kiselev O. I., Deeva E. G., Savateev K. V., Borisov S. S.; patentoobladatel' IOS UrO RAS. – Zajavl. 15.04.13; opubl. 27.09.14.]
9. Gosselin R.E., Hodge H., Smith R.P., Gleason M.N. Clinical Toxicology of Commercial Products: Acute Poisoning. Ed. IV. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. 332 p.
10. Национальный стандарт РФ «Надлежащая клиническая практика» от 04.01.2006 г. [Nacional'nyiy standart RF "Nadlezhashchaya klinicheskaya praktika" ot 04.01.2006 g.] [National standard of the Russian Federation «Good Clinical Practice» from 04.01.2006.]
11. Приказ Минздрава России № 266 от 19.06.2003 «Об утверждении правил клинической практики в Российской Федерации». [Prikaz Minzdrava Rossii № 266 ot 19.06.2003 "Ob utverzhdenii pravil klinicheskoy praktiki v Rossiyskoy Feredecii".] [Order of the Ministry of Health of Russia No. 266 of June 19, 2003 "On the approval of the rules of clinical practice in the Russian Federation".]
12. Guideline for good clinical practice, 1996. ICH harmonised tripartite guideline. International Conference on Harmonisation. URL: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA482.pdf> (accessed on 08.08.2018).
13. Федеральный Закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal'nyiy zakon ot 12.04.2010 g. № 61-FZ "Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv".] [Federal Law № 61-FZ of 12.04.2010 «On circulation of drugs».]
14. Хабриев Р. У. Руководство по проведению клинических исследований новых лекарственных средств. – М.: ФГУ НЦЭСМП, 2005. 357 с. [Khabriev R. U. Rukovodstvo po provedeniyu klinicheskikh issledovaniy novykh lekarstvennykh sredstv. [Guidelines for the clinical trials of new drugs.] – M.: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 2005. 357 p.]
15. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005. FDA/CDER. URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (accessed on 08.08.2018).

МЕТАЛЛОДЕТЕКТОРЫ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

СЕРИЯ THS/PH 21®

ОСНОВНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

- более 45 лет опыта в производстве металлодетекторов
- превосходное качество обнаружения частиц металлов, независящее от скорости прохождения продукта
- самокалибровка металлодетектора в реальном времени
непрерывная автоматическая проверка параметров металлодетектора, обеспечивающая максимальную эффективность
- датчики, контролирующее открытие и закрытие клапана отбраковки
- минимальное время срабатывания клапана отбраковки, гарантирующее 100% отбраковку загрязненного продукта

THS/PH21 N СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ
МЕТАЛЛОДЕТЕКТОР



THS/PH21 N-DT -
металлодетектор в пылезащищенном
исполнении



THS/PH21 N-WI P -
металлодетектор с функцией
мойка-на-месте



THS/FBB • THS/MBV -
инспекционные **КОНВЕЙЕРЫ**



УДК 543.544; 615.074

РЕКОМЕНДАЦИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ФАРМАКОПЕИ «РЕГУЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ» И ИХ ОГРАНИЧЕНИЯ ДЛЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ

Н. А. Эпштейн^{1*}, В. Л. Севастьянова¹, А. И. Королева¹

Резюме. Рассмотрены рекомендации о допустимых изменениях условий хроматографирования, приведенные в главе 2.2.46 Европейской Фармакопеи в разделе «Регулирование условий хроматографирования». На основании опыта исследований робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ и литературных данных указано, какие из этих рекомендаций не годятся или имеют существенные ограничения для методик определения примесей. Приведен пример, подтверждающий некоторые из указанных ограничений. Для методик определения примесей рекомендуется: использовать допустимые изменения условий хроматографирования из главы 2.2.46 Европейской Фармакопеи раздела «Adjustment of chromatographic conditions» только в случае отсутствия близко расположенных или частично перекрывающихся пиков примесей, не используемых для контроля разрешающей способности хроматографической системы на хроматограммах испытуемого раствора фармацевтической субстанции / лекарственного препарата на конце срока годности; альтернативное условие – отсутствие таких пиков на хроматограммах растворов, получаемых при стрессовых исследованиях с субстанцией лекарственного вещества; устанавливать допустимые пределы изменения (коррекции) условий хроматографирования на основании исследования робастности методик и включать их при необходимости как дополнение к условиям хроматографирования.

Ключевые слова: допустимые изменения условий хроматографирования, примеси, ограничения, ВЭЖХ, УЭЖХ.

RECOMMENDATIONS OF THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA «ADJUSTMENT OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS» AND THEIR RESTRICTIONS FOR THE METHODS OF IMPURITIES DETERMINATION

N. A. Epshtein^{1*}, V. L. Sevastianova¹, A. I. Koroleva¹

Abstract. The recommendations of admissible corrections of the chromatographic conditions provided in chapter 2.2.46 of the European Pharmacopoeia in the section "Adjustment of chromatographic conditions" are examined. Based on experience of the investigation of robustness of HPLC and UPLC methods and literary data, the article points out which of these recommendations are not suitable or have significant restrictions for the methods of impurities determination. An example that confirms some of the specified restrictions is given. For methods for determining impurities, it is recommended: to use admissible corrections of the chromatographic conditions from chapter 2.2.46 of the European Pharmacopoeia, in section "Adjustment of chromatographic conditions" only in the absence of closely located or partially overlapping peaks of impurities not used for control of the resolution of chromatographic system on the chromatograms of the test solution of pharmaceutical substance / drug at the end of its shelf-life or on the chromatograms of the sample solutions after stress testing; an alternative condition is the absence of such peaks on the chromatograms of the solutions obtained under stress testing with the drug substance; to set admissible limits for the change (corrections) of the chromatographic conditions on the basis of the investigation of the robustness of the methods, and to include them, if necessary, in the methods.

Keywords: adjustment of chromatographic conditions, impurities, restrictions, HPLC, UPLC.

1 – АО «ШТАДА ФармДевелопмент», АО «НИЖФАРМ», 127273, Россия, г. Москва, ул. Отрадная, д. 2Б, стр. 9

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», SC «NIZHPHARM», 2B, b. 9, Otradnaya str., Moscow, 127273, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: naumeptshtein@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы, связанные с ревалидацией хроматографических методик, до сих пор являются актуальными на практике из-за большого количества факторов, способных влиять на валидационные характеристики методики и ее робастность [1–4]. В главе 2.2.46 Европейской Фармакопеи (EP) «Chromatographic separation techniques» в разделе «Adjustment of chromatographic conditions» («Регулирование условий хроматографирования») приведены рекомендации о допустимых

изменениях условий хроматографирования [5]. При этом отмечено, что не нужна ревалидация методики, если изменяют условия хроматографирования в указанных пределах и при этом выполняются требования пригодности хроматографической системы. Однако наш опыт исследования робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ показал, что многие из рекомендуемых допустимых изменений условий хроматографирования, указанных в EP [5], имеют существенные ограничения, а некоторые даже не годятся в случае методик определения примесей. Это согласуется с наличием в [6] реко-

мендаций, аналогичных приведенным в главе 2.2.46 EP, но только для методик количественного определения (Assay), и введением дополнительных ограничений для допустимого изменения состава подвижной фазы, размера частиц, размера колонки и т.д. в USP [7].

Цель статьи: проанализировать допустимые изменения (далее корректировки) условий хроматографирования для жидкостной хроматографии, указанные в главе 2.2.46 Европейской Фармакопеи, с точки зрения их пригодности для методик определения примесей, а также дать рекомендации, основанные на литературных данных и на нашем опыте.

Прежде всего подчеркнем, что допустимые корректировки условий хроматографирования должны основываться на теоретических доводах, а также на опыте исследования робастности аналитических методик [1]. На основании этой предпосылки мы провели анализ рекомендаций «Adjustment of chromatographic conditions» из главы 2.2.46 Европейской Фармакопеи с точки зрения их пригодности для методик определения примесей. Результаты анализа систематизированы

в таблице 1, в ней указаны ограничения, препятствующие применению некоторых рекомендаций EP [5] по допустимым корректировкам условий хроматографирования для методик определения примесей. Эти ограничения дополнены важными, на наш взгляд, рекомендациями из Фармакопеи США [7].

Проиллюстрируем некоторые из ограничений, указанных в таблице 1, на примерах, полученных при исследовании робастности изократической методики определения примесей в новом препарате, которые произвели на нас особенно сильное впечатление.

Условия хроматографирования: колонка XBridge C18, 250×4,6 мм, 5 мкм; подвижная фаза: 0,05 М фосфатный буфер с pH=8,0 – метанол – ацетонитрил (47:46:7); скорость потока 1,0 мл/мин; объем вводимой пробы 10 мкл; детектор УФ 215 нм; температура колонки 35 °С. В требованиях пригодности хроматографической системы нормируется разрешение между пиком основного вещества и примеси с RRT около 1,09: Peak-to-valley ratio (p/v) – не менее 1,5.

Таблица 1.

Результаты оценки пригодности для методик определения примесей рекомендаций о допустимых изменениях условий хроматографирования, указанных в главе 2.2.46 Европейской Фармакопеи

Рекомендация EP	Ограничение использования
1	2
Изократическое элюирование	
Состав подвижной фазы: содержание компонента-растворителя, присутствующего в меньшем количестве, может корректироваться в пределах $\pm 30\%$ (относительное содержание) или $\pm 2\%$ (абсолютное содержание) в зависимости от того, какое из них больше. Например, для меньшего по содержанию компонента, составляющего 10% подвижной фазы, корректирование относительного содержания на 30% допускает предельные значения от 7% до 13%, а корректирование абсолютного содержания на 2% допускает предельные значения от 8% до 12%, т.е. корректирование по относительному содержанию больше. Для меньшего по содержанию компонента, составляющего 5% подвижной фазы, корректирование относительного содержания на 30% допускает предельные значения от 3,5% до 6,5%, а корректирование абсолютного содержания на 2% допускает предельные значения от 3% до 7%, т.е. в данном случае корректирование по абсолютному содержанию больше. Абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более чем на 10%.	Высокий риск неприемлемости этих корректировок для методик определения примесей, если на хроматограммах могут быть близко расположенные или частично перекрывающиеся пики примесей, которые не указаны в требованиях пригодности хроматографической системы (ППХС) – критические методики. Нет теоретического обоснования. Фармакопея США допускает изменение содержания минорных компонентов подвижной фазы (содержание $\leq 50\%$) на $\pm 30\%$ относительных; при этом изменение содержания любого компонента подвижной фазы не должно превышать 10% абсолютных (по отношению ко всей подвижной фазе) [7].
Скорость подвижной фазы: $\pm 50\%$. При изменении размеров колонки допускается большее корректирование (см. формулу ниже).	Неприменимо для критических методик. Нет теоретического обоснования.
Температура: ± 10 °С в случае контролируемой рабочей температуры при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.	То же
pH водного компонента подвижной фазы: $\pm 0,2$ pH при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье или $\pm 1,0$ pH в случае испытания неионизированных веществ.	То же не исключено. Поэтому для критических методик следует проверять сохранение специфичности при изменении pH на $\pm 0,2$ pH.
Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: $\pm 10\%$.	Иногда неприменимо для ионообменной хроматографии; нет теоретического обоснования.
<i>Характеристики колонки:</i>	
Неподвижная фаза: <ul style="list-style-type: none"> не допускается изменение заместителей неподвижной фазы (т.е. не допускается замена C₁₈ на C₈); 	Не учтена важность различия в селективности однопорных сорбентов. Для методик определения примесей: даже замена однопорной колонки (например, одного сорбента C ₁₈ на другой сорбент C ₁₈) требует ревалидации методики по характеристике «специфичность».

Рекомендация ЕР	Ограничение использования
1	2
<p>размер частиц: допускается максимальное уменьшение размера на 50%, увеличение не допускается;</p>	<p>Нет теоретического обоснования. Фармакопея США обуславливает допустимое изменение размера частиц тем, что должно оставаться постоянным или изменяться в пределах от -25% до +50% отношение длины колонки (L) к размеру частиц (dp) или число теоретических тарелок должно изменяться в пределах от -25% до +50% по отношению к номинальным значениям.</p>
<p>Размер колонки:</p> <ul style="list-style-type: none"> длина: $\pm 70\%$; внутренний диаметр: $\pm 25\%$. <p>При изменении размера колонки скорость подвижной фазы (ПФ) может корректироваться при необходимости по формуле:</p> $F_2 = F_1 \frac{L_2 \cdot d_2^2}{L_1 \cdot d_1^2},$ <p>где F_1 – скорость ПФ, указанная в частной фармакопейной статье (ФС), мл/мин; F_2 – скорректированная скорость ПФ, мл/мин; L_1 – длина колонки, указанная в частной ФС, мм; L_2 – длина используемой колонки, мм; d_1^2 – внутренний диаметр колонки, указанный в частной ФС, мм; d_2^2 – внутренний диаметр используемой колонки, мм.</p>	<p>Формула имеет теоретическое обоснование для сохранения времени удерживания вещества, однако ее применение не гарантирует валидность методики определения примесей по характеристике «специфичность».</p> <p>Фармакопея США вводит дополнительное требование: эффективность колонки не должна изменяться больше чем на 20%.</p>
<p>Длина волны детектора: корректирование не допускается.</p>	<p>Есть теоретическое обоснование.</p>
<p>Объем вводимой пробы: может быть уменьшен при условии, что используемое детектирование и повторяемость пика(ов) остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.</p>	<p>Лучше использовать рекомендацию Фармакопеи США: «Объем инъекции можно регулировать настолько, насколько это согласуется с принятой прецизионностью, линейностью и пределами детектирования» [7].</p>
Градиентное элюирование	
<p>Состав подвижной фазы градиентного элюирования: незначительное корректирование состава подвижной фазы и системы градиента допустимо при следующих условиях:</p> <ul style="list-style-type: none"> выполняются требования пригодности хроматографической системы; основной(ые) пик(и) элюируется в пределах $\pm 15\%$ от указанного(ых) времени(ен) удерживания; элюирующая способность конечного состава подвижной фазы должна быть не ниже, чем у состава, указанного в частной фармакопейной статье. <p>Если соответствие требованиям пригодности хроматографической системы не может быть достигнуто, предпочтительной зачастую является оценка объема задержки или замена хроматографической колонки.</p>	<p>В большинстве случаев эти рекомендации неприменимы для методик определения примесей из-за потери селективности методики; допустима только коррекция программы градиента с учетом объема задержки.</p> <p>Фармакопея США не рекомендует использовать коррекции состава подвижной фазы для изменения условий хроматографирования методик с градиентным элюированием [7] (потребуется ревалидация методики).</p>
<p>Объем задержки (Dwell Volume). Конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, время удерживания или относительное удержание, описанные в методике, например из-за избыточного объема задержки. В частных фармакопейных статьях обычно включают изократическую стадию до начала программы градиентного элюирования, обеспечивая адаптацию к временным точкам градиента с учетом разницы в объеме задержки между системой, использованной при разработке частной фармакопейной статьи, и фактически используемой системой. Адаптация продолжительности изократической стадии в зависимости от используемого аналитического оборудования входит в ответственность пользователя. Если в частной фармакопейной статье приведен объем задержки, установленный при ее разработке, то временные точки (t, мин), указанные в таблице градиента, могут быть заменены на адаптированные временные точки (t_c, мин), рассчитанные по формуле:</p> $t_c = t \cdot \frac{D - D_o}{F},$ <p>где D – объем задержки, мл; D_o – объем задержки, использованный при разработке методики, мл; F – скорость подвижной фазы, мл/мин.</p> <p>Изократическая стадия, введенная с данной целью, может быть исключена при наличии данных по валидации методики, применяемой без указанной стадии.</p>	<p>Есть теоретическое обоснование.</p>
<p>pH водного компонента подвижной фазы: корректирование не допускается.</p>	<p>Требование основано на практике</p>

Рекомендация ЕР	Ограничение использования
1	2
Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: корректирование не допускается.	Требование основано на практике
Скорость подвижной фазы: корректирование допускается при изменении размеров колонки (см. формулу, указанную ниже). Неподвижная фаза: не допускается изменение заместителей неподвижной фазы (т.е. не допускается замена C_{18} на C_8);	Не учтена важность различия в селективности однопористых сорбентов. Для методик определения примесей даже замена однотипной колонки (например, одного сорбента C_{18} на другой сорбент C_{18}) требует ревалидации методики по характеристике «специфичность».
размер частиц: корректировка не допускается;	Требование основано на практике
Размер колонки: • длина: $\pm 70\%$; • внутренний диаметр: $\pm 25\%$. При изменении размера колонки скорость подвижной фазы может корректироваться при необходимости по формуле (обозначения см. выше): $F_2 = F_1 \frac{L_2 \cdot d_2^2}{L_1 \cdot d_1^2}$	Допустимая коррекция теоретически не обоснована и не гарантирует валидность методики определения примесей по характеристике «специфичность». Фармакопея США не рекомендует коррекции F , L и d для методик с градиентным элюированием [7].
Температура: $\pm 5^\circ\text{C}$ в случае контролируемой рабочей температуры при отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье.	Нет теоретического обоснования. Увеличение температуры действует как увеличение содержания более сильного элюента, поэтому высокий риск потери селективности в случае критических (см. выше) методик.
Длина волны детектора: корректирование не допускается.	Есть теоретическое обоснование.
Объем вводимой пробы: может быть уменьшен при условии, что используемое детектирование и повторяемость пика(ов) остаются удовлетворительными; увеличение не допускается.	Лучше использовать рекомендацию Фармакопеи США: «Объем инъекции можно регулировать настолько, насколько это согласуется с принятой прецизионностью, линейностью и пределами детектирования» [7].

В таблице 2 представлены факторы высокого и среднего риска и пределы их изменения при исследовании робастности методики. Обращаем внимание на то, что в качестве допустимого предела изменения содержания элюентов рассматривали $\pm 2,0\%$ относитель-

ных и наихудшие случаи в соответствии с обоснованием, приведенным в [1].

На рисунках 1–3 приведены хроматограммы испытуемого раствора, полученные при условиях, указанных в методике, а также при изменении факторов,

Таблица 2.

Факторы высокого и среднего риска и пределы их изменения при исследовании робастности рассматриваемой методики

№	Факторы	Единица измерения	Значение по методике	Пределы изменения	Уровень (-1)*	Уровень (+1)*
1.	Состав подвижной фазы (ПФ)	%	Буфер – MeOH – ACN = 470:460:70	$\pm 2\%$ отн.	Буфер/MeOH/ACN = 479,4 : 450,8 : 68,6	Буфер/MeOH/ACN = 460,6 : 469,2 : 71,4
2.	Буфер: значение pH буфера	pH	8,0	$\pm 0,10$ pH	7,90	8,10
3.	Буфер: концентрация соли в буфере (C_{buff})	мг/мл	Раствор смеси 6,80 г калия дигидрофосфата и 1,872 г натрия гидроксида в 1000 мл воды, доведенный до pH=8,00.	$\pm 10\%$	Раствор смеси 6,12 г калия дигидрофосфата и 1,685 г натрия гидроксида в 1000 мл воды, доведенный до pH=8,00.	Раствор смеси 7,48 г калия дигидрофосфата и 2,059 г натрия гидроксида в 1000 мл воды, доведенный до pH=8,00.
4.	Скорость потока (F)	мл/мин	1,0	$\pm 2\%$	0,98	1,02
5.	Температура колонки (T)	$^\circ\text{C}$	35	$\pm 3^\circ\text{C}$	32	38
6.	Длина волны (λ)	нм	215	± 2 нм	213	217
7.	Колонка*	–	–	–	Колонка 1	Колонка 2

Примечание: * Хроматографическая колонка 2 содержит такой же сорбент, как и колонка 1, но другой серии.

оказавшихся критическими [1] для этой методики: скорости потока, температуры колонки и pH фосфатного буферного раствора.

Влияние изменения скорости потока на $\pm 2,0\%$.

При сопоставлении хроматограмм на рисунке 1 (вверху) видно, что в соответствии с теорией при увеличении скорости потока F на $2,0\%$ пики основного вещества и примесей немного смещаются влево (зеленый цвет), а при уменьшении F на $2,0\%$ смещаются вправо (синий цвет) относительно условий хроматографирования по методике (красный цвет). При этом разрешение между пиком основного вещества и примеси с RRT около 1,09 изменяется незначительно и соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. В то же время, как видно из рисунка 1 (внизу, увеличенный масштаб), увеличение скорости потока всего на $2,0\%$ приводит к практически полному перекрыванию некоторых пиков примесей, а именно выходящих при номинальных (по методике) условиях с RRT около 0,49 ($RT \approx 27,5$ мин) и около 0,53 ($RT \approx 29,1$ мин), а также к значительному перекрыванию пиков примесей в об-

ласти 14–16 мин и 21–23 мин. Отметим, что при номинальных условиях пики этих примесей были хорошо разделены и поэтому не были включены в требования пригодности хроматографической системы.

Влияние изменения температуры хроматографической колонки. Увеличение температуры (T) хроматографической колонки и, следовательно, подвижной фазы на три градуса ($+3$ °C), как видно из рисунка 2 (вверху), действует аналогично увеличению содержания более сильного элюента [8] – пики смещаются влево (зеленый цвет), а при уменьшении T на три градуса (-3 °C) – смещаются вправо (синий цвет) относительно условий хроматографирования по методике (красный цвет). При этом разрешение между пиком основного вещества и примеси с RRT около 1,09 изменяется незначительно и соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. Из увеличенного участка хроматограммы (рисунк 2, внизу) видно, что изменение температуры хроматографической колонки всего на $+3$ °C приводит к значительному перекрыванию пиков примесей, выходящих при номи-

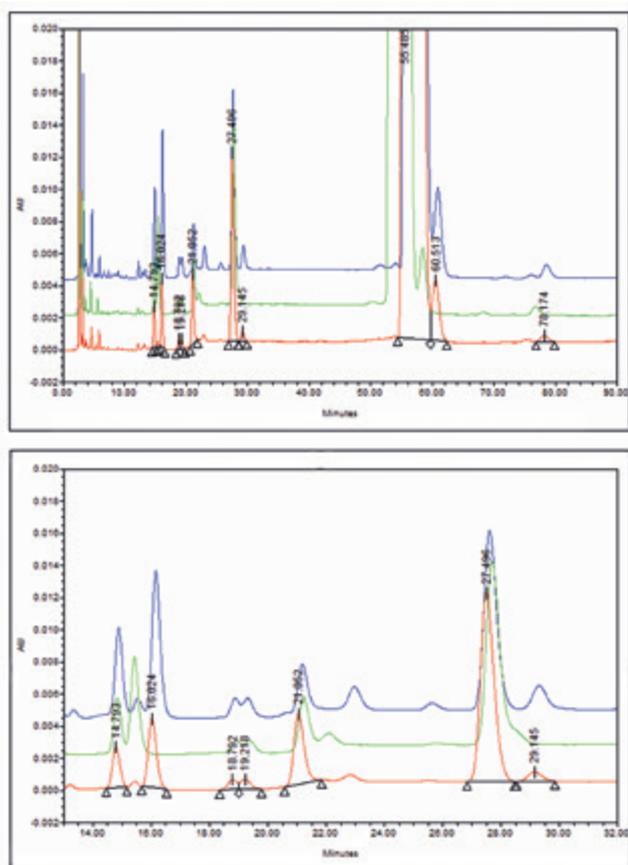


Рисунок 1. Наложение хроматограмм испытуемых растворов для определения примесей: красный цвет – нормальные условия, синий цвет – при уменьшении скорости потока на $2,0\%$, зеленый цвет – при увеличении скорости потока на $2,0\%$. Внизу – увеличенный масштаб (с небольшим сдвигом) для большей наглядности перекрывания пиков в области 14–16 мин, 21–23 мин и 27–30 мин при увеличении скорости потока на $2,0\%$

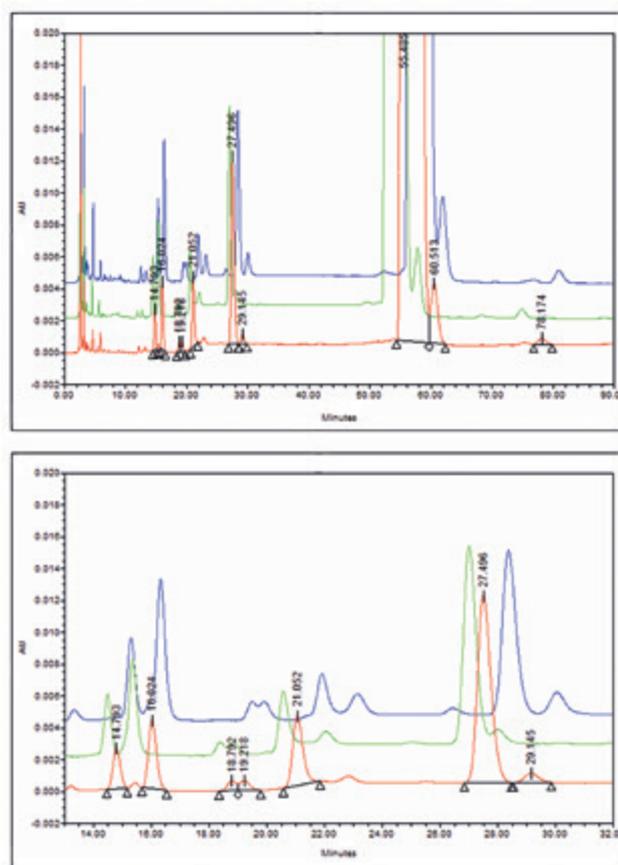


Рисунок 2. Наложение хроматограмм испытуемых растворов для определения примесей: красный цвет – нормальные условия, синий цвет – при уменьшении температуры колонки на 3 °C, зеленый цвет – при увеличении температуры колонки на 3 °C. Внизу – увеличенный масштаб (с небольшим сдвигом) для большей наглядности перекрывания пиков в области 27–30 мин при увеличении температуры колонки на 3 °C

нальных условиях с RRT около 0,49 (RT≈27,5 мин) и около 0,53 (RT≈29,1 мин); это приводит к большой ошибке определения содержания этих примесей по сравнению с результатом их обсчета по хроматограмме, полученной при номинальных условиях. Пики примесей в области 14–16 мин и 21–23 мин остаются достаточно хорошо разделенными, то есть увеличение температуры имеет разное воздействие на разные примеси, и это можно объяснить прежде всего различной энергией сорбции молекул примесей.

Влияние изменения pH фосфатного буфера.

Уменьшение pH фосфатного буфера на 0,1 (pH=7,9), как видно из рисунка 2 (вверху), приводит к тому, что пики некоторых примесей смещаются влево (зеленый цвет), а при увеличении pH на 0,1 (pH=8,1) – смещаются вправо (синий цвет) относительно условий хроматографирования по методике (красный цвет). При этом разрешение между пиком основного вещества и примеси с RRT около 1,09 изменяется незначительно и соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. Из увеличенного участка хроматограммы (рисунок 3, внизу) видно, что уменьшение pH буфера всего лишь на 0,1 приводит к практически полному перекрытию пиков примесей, выходящих при номинальных условиях с RRT около 0,49 (RT≈27,5 мин) и около 0,53 (RT≈29,1 мин), а также к значительному перекрытию пиков примесей в области 14–16 мин и 21–23 мин.

В таблице 3 в качестве примера приведены значения разрешения Rs между пиками примесей, выходящих при номинальных условиях с RRT около 0,49 (RT≈27,5 мин) и около 0,53 (RT≈29,1 мин).

На основании полученных результатов можно сделать следующие важные выводы: даже при выполнении требований к пригодности хроматографической системы изократическая методика определения примесей может стать неробастной при:

- увеличении скорости потока F на 2,0%, хотя EP допускает изменение F на ±50% (таблица 1);
- увеличении температуры T колонки на 3 °C, хотя EP допускает изменение T на ±10 °C (таблица 1);

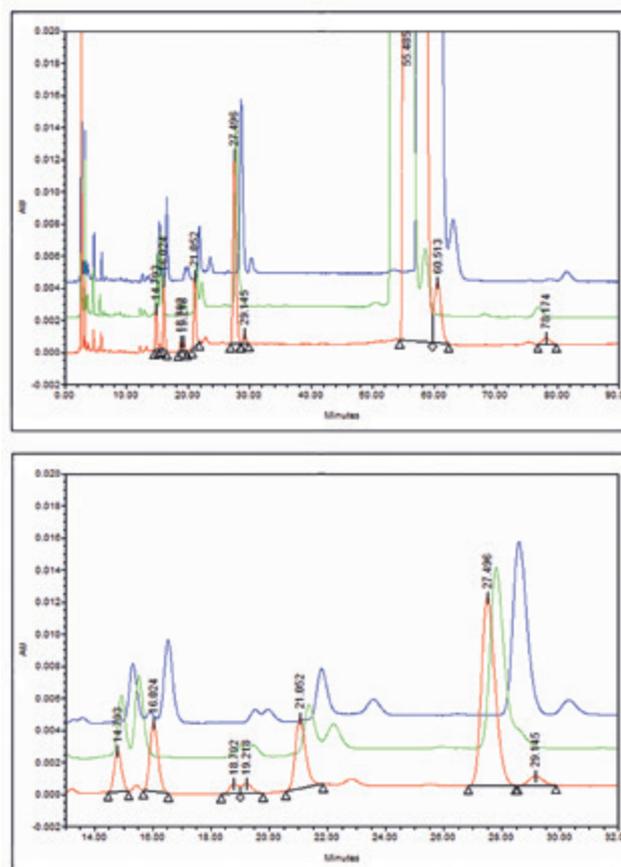


Рисунок 3. Наложение хроматограмм испытуемых растворов для определения примесей: красный цвет – нормальные условия, синий цвет – при увеличении pH буфера на 0,1 (pH=8,1), зеленый цвет – при уменьшении pH буфера на 0,1 (pH=7,9). Внизу – увеличенный масштаб (с небольшим сдвигом) для большей наглядности перекрытия пиков в области 14–16 мин, 21–23 мин и 27–30 мин при уменьшении pH буфера на 0,1

- уменьшении pH на 0,1, хотя EP допускает изменение pH на ±0,2 (таблица 1).

Как видим, значения критических изменений скорости потока и температуры оказались значительно меньшими, чем допускается в разделе «Adjustment of chromatographic conditions» главы 2.2.46 Европейской Фармакопеи [5], также меньшим оказалось и критическое значение pH.

Таблица 3.

Критические факторы, установленные при исследовании робастности изократической методики определения примесей*

Отклик \ Факторы	F (-2,0%)	F (+2,0%)	T (-3 °C)	T (+3 °C)	pH (+0,1pH)	pH (-0,1pH)
Разрешение Rs между пиками с RRT около 0,49 (RT~27 мин) и около 0,53 (RT~29 мин) на хроматограмме испытуемого раствора**	2,0	Практически полное перекрытие пиков	1,85	Значительное перекрытие пиков***	1,9	Практически полное перекрытие пиков

Примечание: * Обозначения факторов см. в табл. 2.

** При условиях по методике Rs ≈ 1,9.

*** Приводит к большой ошибке определения содержания примесей по сравнению с результатом обсчета хорошо разделенных пиков на хроматограмме, полученной при условиях по методике

Характерно, что у рассмотренной методики на хроматограммах испытуемого раствора, а также растворов образцов после стрессовых экспериментов имелись близко расположенные пики примесей, которые не были указаны в требованиях пригодности хроматографической системы, так как они были достаточно хорошо разделены при номинальных условиях. Возможность перекрытия некоторых из таких пиков была установлена только при исследовании робастности методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты, а также наш опыт исследования робастности методик ВЭЖХ и УЭЖХ показывает, что:

- в случае методик определения примесей индикатором непригодности рекомендаций Европейской Фармакопеи [5] о допустимых изменениях условий хроматографирования является наличие на хроматограммах испытуемого раствора фармацевтической субстанции / лекарственного препарата на конце срока годности или на хроматограммах растворов образцов субстанции после стрессовых исследований близко расположенных или частично перекрывающихся пиков примесей, не используемых для контроля разрешающей способности хроматографической системы (критические методики согласно таблице 1).

Для методик определения примесей рекомендуем:

- использовать допустимые изменения условий хроматографирования из главы 2.2.46 Европейской Фармакопеи раздела «Adjustment of chromatographic conditions» только при отсутствии на хроматограмме испытуемого раствора фармацевтической субстанции / лекарственного препарата на конце срока годности близко расположенных или частично перекрывающихся пиков примесей, не используемых для контроля разрешающей способности хроматографической системы. Альтернативное условие – отсутствие таких пиков на хроматограммах растворов, получаемых при стрессовых исследованиях с субстанцией лекарственного вещества. Для снижения риска невалидности методики при изменении условий хроматографирования целесообразно учитывать ограничения, указанные в таблице 1;
- устанавливать допустимые пределы изменения (допустимые коррекции) условий хроматографирования на основании исследования робастности методик и включать их при необходимости как дополнение к условиям хроматографирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Исследование робастности при валидации методик ВЭЖХ и УЭЖХ: современный подход, включающий анализ рисков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 1(22). С. 96–110. [Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Issledovanie robastnosti pri validatsii metodik VEZhKh i UEZhKh: sovremennyy podkhod, vklyuchayushchii analiz riskov // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2018. № 1(22). P. 96–110.]
2. Vander Heyden Y., Nassart D. L. Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry // Robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products / Ed. by Hendriks M.W.B., de Boer J.H., Smilde A.K. – Amsterdam: Elsevier Science B.V. 1996. P. 79–147.
3. Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J. et al. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2001. V. 24. № 5–6. P. 723–753.
4. Эрмер Й., Миллер Дж. Х. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. – М.: ВИАЛЕК. 2013. 495 с. [Ermer I., Miller Dzh. Kh. Validatsiya metodik v farmatsevticheskom analize. Primery nailuchshikh praktik. – M.: VIALEK. 2013. 495 s.]
5. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice / Ed. by Remer J., Miller J. H. – Wenham: Wiley-VT Verlag GmbH & Co. Ka. 2005. 403 p.
6. European Pharmacopoeia 9th ed. Chapter 2.2.46. Chromatographic separation techniques. 2017.
7. Majors R. E., Snyder L. R., Dolan J. W. Adjusting Conditions for a Routine Reversed Phase HPLC Assay. Part 2: Changing Separation Conditions // LC•GC Europe. 2005. V. 18. № 6. P. 324–329.
8. The United States Pharmacopoeia. <621> Chromatography. USP39–NF34. 2016.
9. Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. Practical HPLC Method Development. 2nd ed. – N.Y.: J. Wiley, 1997. P. 242.



XX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ В СФЕРЕ ОБРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ФармМедОбращение 2018

Включено в План научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2018 год
(Приказ № 141 от 30 марта 2018г., пункт 105)

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Пленарное заседание

- Современная регуляторная система в сфере обращения лекарственных средств — глобальные тренды, вызовы, возможности

Секции

- Качество лекарственных препаратов как одна из основных составляющих обеспечения прав граждан на качественную лекарственную помощь
- Актуальные вопросы регулирования обращения биомедицинских клеточных продуктов
- Цифровизация в здравоохранении
- PR-технологии в сфере фармацевтики
- Актуальные вопросы законодательства ЕАЭС в сфере фармаконадзора. Современные требования к обеспечению безопасного применения лекарственных средств
- Кадровая политика и подготовка фармацевтических специалистов
- Современные требования действующего законодательства к контролю и обращению наркотических средств и психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений на территории Российской Федерации.
- Лекарственное обеспечение в целях обезболевания
- Система МДЛП. От эксперимента к полномасштабному внедрению
- Экспертиза и регистрация лекарственных средств
- Актуальные вопросы контроля и надзора в сфере обращения лекарственных средств
- Российская фармацевтическая промышленность. Вызовы и перспективы.
- Актуальные вопросы государственного контроля проведения клинических исследований лекарственных препаратов в Российской Федерации и ЕАЭС. Современные требования к организации и проведению клинических исследований
- Совершенствование системы лекарственного обеспечения в Российской Федерации. Совершенствование системы закупок лекарственных препаратов для государственных и муниципальных нужд
- Регистрация медицинских изделий на территории Российской Федерации и в рамках законодательства Евразийского экономического союза
- Особенности проведения государственного контроля за обращением медицинских изделий

Круглые столы

- Совершенствование системы закупок медицинских изделий для государственных и муниципальных нужд. Регулирование цен на медицинские изделия
- Проблемы формирования и распространения фармацевтической информации
- Оценка возможности использования международных подходов расширения доступности ЛС в РФ

В работе Конференции примут участие представители федеральных и региональных органов законодательной и исполнительной власти Российской Федерации, профильных зарубежных регуляторных органов и международных организаций, научно-исследовательских и общественных организаций, профессиональных ассоциаций, оптовых и розничных организаций и производителей медицинской продукции.

Для сотрудников региональных органов управления здравоохранением предусмотрено участие без оплаты организационного взноса (необходимо официальное письмо об участии, подробная информация на сайте www.fru.ru)

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru, skype: fru2012

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

УДК 347.771

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТЕНТНОЙ ПРАКТИКИ В ДЕЯТЕЛЬНОСТИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА

А. И. Громакова^{1*}, Е. В. Король¹, О. А. Семкина¹

Резюме. В статье изложена информация об использовании научными работниками умений и навыков в сфере проведения исследований в области патентования, внедрения в производственный процесс новейших и прогрессивных результатов собственных разработок, а также вопросы регистрации сведений о результатах интеллектуальной деятельности в базах данных ЕГИСУ НИОКТР и ПАРУС (ФАНО) России. Представлены аспекты научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР в области интеллектуальной собственности, позволяющие сделать результаты научной деятельности института более востребованными и значимыми.

Ключевые слова: патентование, интеллектуальная собственность, патент, товарный знак, полезная модель, промышленная собственность.

MODERN ASPECTS OF PATENT PRACTICE IN THE ACTIVITY OF THE SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE

A. I. Gromakova^{1*}, E. V. Korol¹, O. A. Semkina¹

Abstract. The article contains information on the use by scientists of skills and abilities to conduct research in the field of patent science, to introduce the latest and progressive results of your developments into the production process. The presented aspects of the research work of the FGBNU VILAR in the field of intellectual property, allowing to make the results of scientific activity more relevant and significant.

Keywords: patenting, intellectual property, patent, trademark, utility model, industrial property.

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

1 – All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), 7, Grina str., Moscow, 117216, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: semkinaolga@gmail.com

Тел.: 8 (495) 388 11 09

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях развития научно-технического прогресса, постоянного обновления научной информации важное значение приобретает деятельность в области патентования, анализа и учета результатов интеллектуальной деятельности.

Экономические условия развития нашей страны, учет требований ФАНО России и постановлений Правительства РФ предопределяют необходимость включения сведений по результатам интеллектуальной деятельности (РИД) в базы данных ПАРУС (ФАНО России) и ЕГИСУ НИОКТР. В связи с этим встал вопрос о необходимости систематизации и анализа патентной деятельности в ФГБНУ ВИЛАР.

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР) – научное учреждение, проводящее весь комплекс научных исследова-

ний, от поиска биологически активных веществ и проведения доклинических исследований до разработки технологии получения субстанций и лекарственных средств на их основе, создания сырьевой базы и разработки агротехнологий возделывания лекарственного растительного сырья [1].

Для достижения поставленной цели в рамках проведения НИР институт решает задачи, включающие следующие исследования:

- ✓ исследования биологических структур на стадиях их формирования, функционирования и сохранения;
- ✓ мобилизацию генетических ресурсов лекарственных и ароматических растений для сохранения генофонда, создания адаптивно-устойчивых сортов, агротехнологий и штаммов клеточных культур лекарственных растений с целью развития сырьевой базы для фитопрепаратов;

- ✓ научное формирование, сохранение и изучение биокolleкций генофонда различного направления с целью создания новых лекарственных средств;
- ✓ проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья;
- ✓ поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из нативного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм [2].

В новых экономических условиях система управления патентно-лицензионной и изобретательской деятельностью становится структурным элементом в системе научно-исследовательской работы института в области создания новых сортов лекарственных растений, разработки агротехнологий, новых и усовершенствованных технологий получения биологически активных веществ, получения фитопрепаратов, разработки методов их анализа, методик определения фармакологической активности и безопасности препаратов.

В соответствии с законом РФ № 2124-1 от 27.12.91 «О средствах массовой информации» [3] с целью экспертизы материалов научных исследований института, подлежащих правовой охране и направляемых для публикации в открытой печати, а также выступлений по телевидению и радио в ФГБНУ ВИЛАР определен порядок публикации результатов научных исследований сотрудниками института и рассмотрение материалов авторских свидетельств и патентов.

В соответствии с приказами № 52 от 21.04.2015 и № 24 от 15.02.2018 созданы экспертные комиссии:

- по химическим, технологическим, медицинским и биотехнологическим работам;
- по работам в области лекарственного растениеводства.

Все работы, предназначенные для публикации, рассматриваются на заседании экспертных комиссий. По результатам обсуждения экспертная комиссия принимает решение о направлении статьи в печать (оформляется экспертное заключение) либо выносит рекомендации о подготовке материалов на патентование или переработку статьи с учетом замечаний экспертов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Информационную базу исследования составили данные национальной библиографической базы данных РИНЦ, реферативные базы данных публикаций в научных журналах «Web of Science» и «Scopus»,

информационный ресурс Федерального института промышленной собственности (ФИПС), Единая государственная информационная система учета научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения (ЕГИСУ НИОКТР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За период работы экспертных комиссий (с 2015 по 2018 гг.) проведено 56 заседаний, на которых рассмотрено более 140 научных статей, тезисов, монографий, предназначенных для публикации в открытой печати, а также описаний новых изобретений и селекционных достижений. Показатели результативности ФГБНУ ВИЛАР, а именно число публикаций, входящих в РИНЦ, число статей в журналах, входящих в «Web of Science» или «Scopus», RSCI, в перечень ВАК, число монографий и патентов, представлены на рисунке 1.

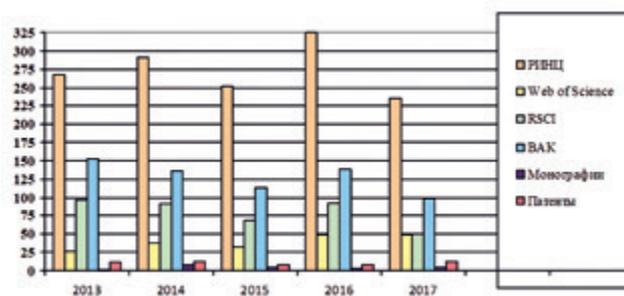


Рисунок 1. Показатели результатов научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР с 2013–2017 гг.

Как видно из рисунка 1, максимальное количество публикаций в РИНЦ, «Web of Science» или «Scopus» приходится на 2016 г. по сравнению с 2017 г., что свидетельствует о возникших сложностях в публикации материалов научно-исследовательской работы в высокорейтинговых журналах, в том числе в журналах, входящих в перечень ВАК. Количество монографий и патентов в 2017 г. по сравнению с другими годами не изменилось и осталось на уровне 9–12 патентов, 3–4 монографий в год.

Институтом проводится активная работа по оформлению и своевременной подаче заявок на результаты интеллектуальной деятельности, включая проведение информационного поиска по выявлению уровня техники заявленного решения. Работы по поиску и анализу информации проводятся в форме патентных исследований, регламентируемых ГОСТ 15.011-96 [4].

Согласно статье УК РФ № 1225 к охраняемым результатам интеллектуальной деятельности и средств индивидуализации относятся 16 объектов, из которых по 5 проводятся работы в институте:

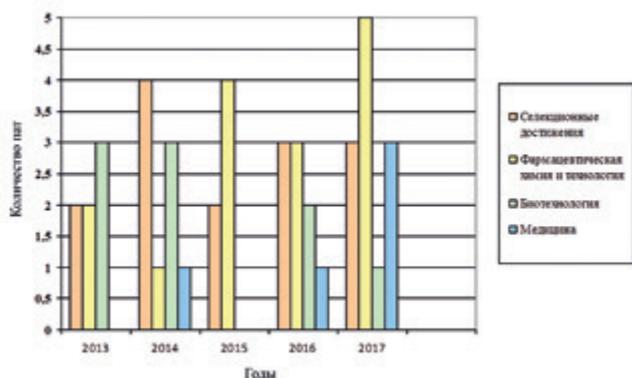


Рисунок 2. Количество патентов, полученных по тематикам ФГБНУ ВИЛАР в период с 2013 по 2017 гг.

- изобретения;
- полезные модели;
- селекционные достижения;
- фирменные наименования;
- товарные знаки.

За последние 5 лет (2013–2017 гг.) институтом получено 44 патента (рисунок 2) на изобретения и полезные модели, сорта лекарственных растений, в том числе 12 – за 2017 год, из них 3 патента получены по технологии лекарственных препаратов, 5 – на способ получения фармацевтических субстанций, 3 – на фармакологическую активность субстанций и препаратов, 3 – на селекционные достижения.

Патентно-лицензионная деятельность ФГБНУ ВИЛАР проводится в соответствии с направлениями научно-исследовательской работы института и государственными регламентами Федерального института промышленной собственности.

Следует отметить, что после получения патента с каждым годом расходы на уплату государственных пошлин за поддержание патента в силе увеличиваются, что требует оценки коммерческой реализуемости патента и принятия решения о его продлении.

В связи с этим научно-организационный отдел проводит анализ действующих объектов интеллектуальной собственности (ИС) на предмет целесообразности (нецелесообразности) дальнейшего поддержания их в силе и предоставляет подготовленный график оплаты государственных пошлин на рассмотрение руководству института.

Утвержденный документ о поддержании патентов в силе передается в бухгалтерию института. Научно-организационный отдел контролирует правильность и своевременность уплаты государственных пошлин, предоставляет руководству института информацию о сроках и размерах платежей, связанных

с правовой охраной результатов интеллектуальной деятельности [2].

Важным направлением деятельности института в современных условиях является оценка и постановка на баланс института объектов интеллектуальной собственности в виде нематериальных активов предприятия. В 2017 году согласно распоряжению от 08.08.2014 г. № 472 ФАНО России «О первоочередных мерах по информатизации Федерального агентства научных организаций» на баланс института поставлено 73 объекта, 12 объектов ИС проходят этап оценки (рисунок 3).

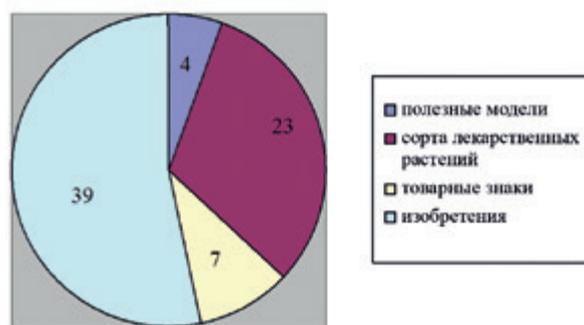


Рисунок 3. Распределение охраняемых результатов интеллектуальной деятельности в зависимости от вида РИД

Анализ представленных на рисунке 3 результатов показывает, что доля изобретений, поставленных на баланс института, составляет 53%, а доля селекционных достижений – 31,5% от общего количества РИД.

В системе управления НИР и ГЗ ФАНО России в обязательном порядке осуществляется учет объектов интеллектуальной собственности с указанием количества поданных заявок на патент, количества полученных охранных документов, а также количества прекращенных охранных документов как в Российской Федерации, так и за её пределами на год подачи отчета (рисунок 4).

По результатам выполнения научно-исследовательской работы в 2017 г. институтом подано 4 заявки на объекты интеллектуальной собственности в РФ, получено 9 охранных документов и прекращено действие 3 патентов.

Проводится работа по фиксированию объектов интеллектуальной собственности в системе ЕГИСУ НИОКТР. Единая государственная информационная система учета результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ гражданского назначения предназначена для:

- учета данных о научных исследованиях и разработках по всем областям знаний в Российской Федерации;

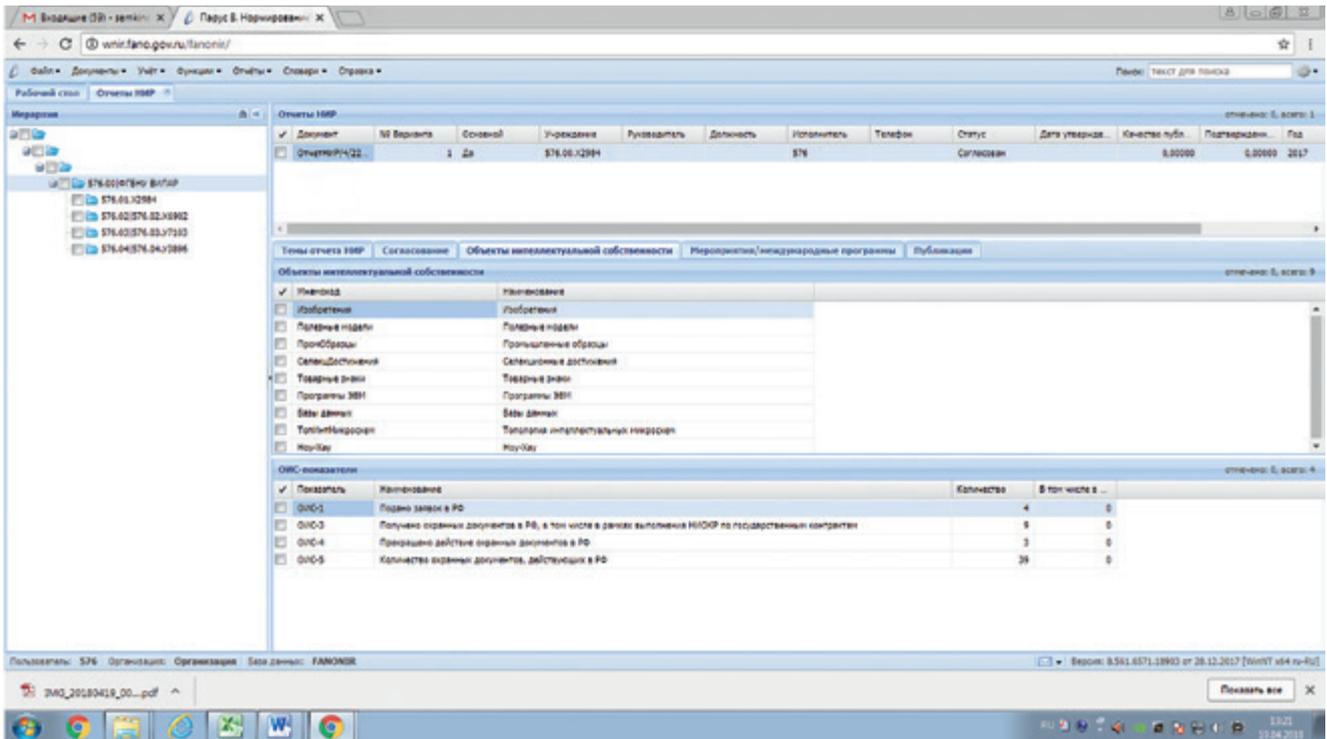


Рисунок 4. Информация об объектах интеллектуальной собственности в системе управления НИР и ГЗ ФАНО России на примере ФГБНУ ВИЛАР

- предоставления информации всем заинтересованным лицам о результатах научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ;
- использования результатов интеллектуальной деятельности.

Основная цель создания ЕГИСУ НИОКТР – развитие единой базы данных по научно-исследователь-

ским и опытно-конструкторским работам, повышение эффективности расходования средств на проведение научных исследований и разработок, а также содействие коммерциализации результатов интеллектуальной деятельности.

В настоящее время в системе представлена информация об объектах интеллектуальной собственности (рисунок 5).

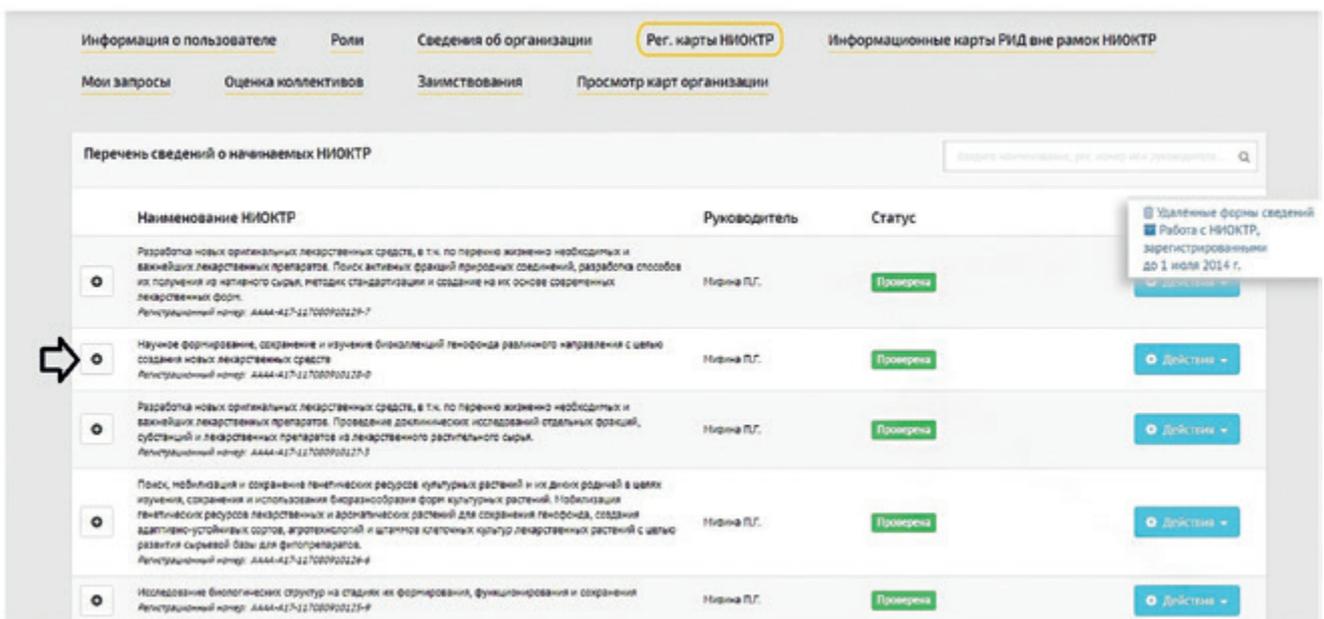


Рисунок 5. Единая государственная информационная система учета результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ на примере ФГБНУ ВИЛАР

№ п/п	Наименование РИД	Статус	Действия
1	Ослинник двулетний "Светлячок"	Проверена	Новый РИД Действия
2	Ромашка аптечная "Чистотел"	Проверена	Действия
3	Арника обыкновенная "ЖАР-ПТИЦА"	Проверена	Действия

Рисунок 6. Сведения о патентах на селекционные достижения по теме «Научное формирование, сохранение и изучение биокolleкций генофонда различного направления с целью создания новых лекарственных средств» за 2017 год

Как видно из рисунка 5, в 2017 году в соответствии с направлениями научных исследований институт работал по пяти темам научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ. К каждой теме НИОКТР института прикрепляются РИД (патенты на полезные модели, селекционные достижения, изобретения), полученные в рамках данной научной работы (рисунок 6).

Размещение РИД в базе данных ЕГИСУ НИОКТР непосредственно в темах научных исследований позволяет правообладателю патента своевременно получить информацию о востребованности результатов интеллектуальной деятельности, связаться с производителями, заинтересованными в патенте, и сформировать договор на использование результатов интеллектуальной деятельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что надлежащим образом организованная деятельность института в сфере интеллектуальной собственности позволяет сделать научный труд сотрудника более значимым, а результаты его научной деятельности более востребованными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Официальный сайт ФГБНУ ВИЛАР. [Ofitsial'nyi sait FGBNU VILAR. [Official site of the All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)]. Available at: <http://vilarnii.ru/> (accessed 04.07.2018).
2. Громакова А. И., Семкина О. А., Сидельников Н. И. Необходимость патентования результатов интеллектуальной деятельности до публикации в открытой печати на примере ФГБНУ ВИЛАР // Сборник трудов третьей научной конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые и фармацевция XXI века». 2015. С.233-237. [Gromakova A. I., Semkina O. A., Sidelnikov N. I. Neobkhodimost' patentovaniya rezul'tatov intellektual'noi deyatel'nosti do publikovaniya v otkrytoi pechati na primere FGBNU VILAR // Sbornik trudov tret'ei nauchnoi konferentsii aspirantov i molodykh uchenykh «Molodye uchenye

i farmatsiya XXI veka». [The necessity of patenting the results of intellectual activity before publication in the open press on the example of the FGBNU VILAR // Collected works of the third scientific conference of graduate students and young scientists «Young Scientists and Pharmacy of the XXI Century».] 2015. P. 233–237.]

3. Закон РФ «О средствах массовой информации» от 27.12.91 г. (редакция от 14.06.2011 г.). [Zakon RF «O sredstvakh massovoi informatsii» ot 27.12.91 g. (redaktsiya ot 14.06.2011 g.)] [The Law of the Russian Federation «On Mass Media» from 27.12.91 (edition of 14.06.2011).]
4. ГОСТ 15.011-96. Система разработки и постановки продукции на производство. Патентные исследования. Содержание и порядок проведения «System of products development and launching into manufacture. Patent investigations. Procedure and scope». (Принят и введен в действие постановлением Госстандарта России от 30 января 1996 года № 40). [GOST 15.011-96. Sistema razrabotki i postanovki produktsii na proizvodstvo. Patentnye issledovaniya. Soderzhanie i poryadok provedeniya «System of products development and launching into manufacture. Patent investigations. Procedure and scope». (Prinyat i vveden v deistvie postanovleniem Gosstandarta Rossii ot 30 yanvarya 1996 goda № 40.)] [System for the development and production of products for production. Patent research. Contents and procedure of «System of products development and launching into manufacture. Patent investigation. Procedure and scope». (Adopted and put into effect by the decision of the State Standard of Russia of January 30, 1996 № 40.)]



Ведущий мировой производитель
пресс инструмента **Теперь в России**

ШИРОКИЙ АССОРТИМЕНТ ПРЕСС ИНСТРУМЕНТА

CELEBRATING
40 YEARS
OF TABLETING EXCELLENCE IN...

стандартной формы, фигурный, многопозиционный, сборный со сменным штоком, для микропланшетов в т.ч. для прессов IMA Comprima, Kilian, Fette, Korch, Bosch–Manesty, GEA и других

- Срок поставки по РФ от 6 недель
- Профессиональная консультация от ведущих специалистов
- Индивидуальный инжиниринг пресс инструмента
- Точность изготовления и износостойкость
- Низкие эксплуатационные затраты
- Комплектующие и узлы для обслуживания инструмента



! За дополнительной информацией обращайтесь к специалистам ГК Фармконтракт

Эксклюзивный представитель Natoli



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 615.15

НЕЗАМЕНИМЫЕ ПОМОЩНИКИ И ПАРТНЁРЫ РОССИЙСКИХ ЕСТЕСТВОИСПЫТАТЕЛЕЙ НА РУБЕЖЕ XIX–XX ВВ.

К. С. Гузев^{1*}

Резюме. В работе представлены сведения о Ф. Б. Швабе и Н. Заклине, предпринимателях конца XIX – начала XX вв., которые своим трудом и смекалкой создали материально-техническую базу, обеспечившую развитие различных отраслей естествознания. Их деятельность способствовала развитию медицины, фармации, химии, биологии, геологии, астрономии и др. Кроме снабжения, они осуществляли определённые просветительские функции. Проявленные ими деловые качества и принципы организации возглавляемых ими предприятий не утратили актуальности и применяются в настоящее время.

Ключевые слова: развитие науки, снабжение медицины и фармации, приборы, оборудование, средства механизации аптек, каталоги медицинских и аптечных изделий.

INDEPENDENT ASSISTANTS AND PARTNERS OF RUSSIAN NATURAL RESEARCHERS ON THE ABROAD OF THE XIX–XX CENTURY

K. S. Guzev^{1*}

Abstract. The paper presents information about F. B. Schwabe and N. Zaklin, entrepreneurs of the late 19th and early 20th centuries who, through their labor and ingenuity, created the material and technical base that provided the development of various branches of natural science. Through their work they contributed to the development of medicine, pharmacy, chemistry, biology, geology, astronomy, etc. In addition to supply, they carried out certain educational functions. The business qualities and principles of organization of the enterprises led by them have not lost their relevance and are being applied at present.

Keywords: development of science, supply of medicine and pharmacy, instruments, equipment, means of mechanization of pharmacies, catalogs of medical and pharmaceutical products.

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, д. 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», b. 5, 2/46, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: guzev3@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Период с середины до конца XIX в. был временем расцвета российской науки, в том числе в области естествознания. Именно в это время Россию прославляли врачи Н. И. Пирогов (1810–1881), И. М. Сеченов (1829–1905), С. П. Боткин (1832–1889), Н. В. Склифосовский (1836–1904), И. И. Мечников (1845–1916), В. М. Бехтерев (1857–1927), эмбриолог К. М. Бэр (1792–1876), физиологи И. П. Павлов (1849–1936) и Н. Е. Введенский (1852–1922), микробиологи Д. И. Ивановский (1864–1920) и В. Л. Омелянский (1867–1928) [1]. Не отставали от них химики А. А. Воскресенский (1809–1880), Н. Н. Зинин (1812–1880), А. М. Бутлеров (1828–1886), Д. И. Менделеев (1834–1907) и фармацевты Ю. К. Трапп (1814–1908), В. А. Тихомиров (1841–1915), И. Г. Драгендорф (1836–1898) [2, 3]. При этом, повествуя о достижениях этих учёных, лишь немногие придавали значение тому факту, что для научных открытий да и для повседневной работы врачей, химиков и фармацевтов необходимо соответствующее оснащение. Так, врачам нужны

приборы для постановки диагноза, инструменты, перевязочный материал, предметы ухода за больными, лекарства. Для химических лабораторий и производств необходимы сырьё (растительное или химическое), реактивы, лабораторное стекло, аналитическое оборудование. Провизоры не могут работать без химических субстанций, лекарственного растительного сырья, вспомогательных веществ, средств малой механизации. По роду занятий нас, конечно, интересуют прежде всего нужды врачей и фармацевтов, но ведь были ещё зоологи, биологи, ботаники, почвоведы и множество учёных иных специальностей. Им также необходимы оборудование, реактивы и другие материалы. И всё это должно быть современным, качественным, удобным, эффективным. Следовательно, этим кто-то должен озаботиться, сделать необходимую вещь или найти её, купить, привезти, сохранить, предоставить. Скорее всего, таких людей было много и о них не принято было писать, что, на наш взгляд, несправедливо. О некоторых из них мы и хотим рассказать в этой статье.

ПОСТАВЩИК ДВОРА ЕГО ИМПЕРАТОРСКОГО ВЕЛИЧЕСТВА

Первая компания, которую необходимо представить, – это московская фирма (впоследствии торговый дом) Федора Борисовича Швабе (1814–1880).

Теодор Швабе родился в Швейцарии в 1814 году и до того, как переехать в Россию, некоторое время жил в Берлине. Согласно документам московского департамента полиции временем появления фирмы обрусевшего швейцарца Теодора, а по-русски – Федора Борисовича Швабе, считается 1837 год. В этом году Ф. Б. Швабе организовал магазин по продаже очков, пенсне и других мелких оптических принадлежностей, получаемых из-за границы. В короткое время это предприятие трансформируется сначала в мастерскую по продаже и ремонту очков, а в дальнейшем в компанию по производству оптических приборов. Изначально магазин и мастерская размещались в Мясницкой части, во 2-м квартале, в доме Шиловского, но достаточно быстро фирма «Ф. Швабе» переезжает в дом князя Голицына на Кузнецком Мосту. Фирма быстро развивается, растёт, и через 13 лет после её основания в мастерской, оборудованной четырьмя токарными станками и одним горном, работало 12 человек. За это время компания освоила производство очков, биноклей, телескопов и ряда геодезических приборов, востребованных на рынке России. Сам Федор Борисович в 1853 году становится купцом 3-й гильдии, а через 5 лет (1858 г.) купцом 2-й гильдии.



Рисунок 1. Портрет Федора Борисовича Швабе

В 1853 году фирма впервые принимает участие во Всероссийской мануфактурной выставке, которая проходила в Москве. На выставке были представле-

ны большой телескоп, несколько микроскопов, весы и солнечные часы с пушкой. Участие в выставке оказалось достаточно успешным: Федор Швабе был награжден большой серебряной медалью. С этого времени фирма «Ф. Швабе» не пропускала ни одной выставки, и её продукция постоянно завоёвывала медали различного достоинства. Ф. Швабе, поняв, что России необходимо собственное производство оптических и физических приборов, расширяет номенклатуру изделий и увеличивает объём выпускаемой продукции. К концу 1850-х годов работники фирмы уже могли собирать почти все оптические приборы того времени: лупы, зрительные трубы, микроскопы, бинокли и др. В магазине на Кузнецком Мосту были выделены специальные отделы для продажи хирургических и ветеринарных инструментов, оптики (очки, пенсне, лупы, бинокли, подзорные трубы, телескопы, микроскопы), физических и геодезических приборов. Отдельно были организованы рентгеновский кабинет, отдел муляжей и учебных пособий, а также ортопедическая мастерская по изготовлению и ремонту протезов.

В работе с клиентами Ф. Швабе применял новые для того времени способы работы. Так, одна из первых астрономических обсерваторий в России появилась на крыше здания его компании. Там была построена небольшая астрономическая башня с люками в куполе, откуда все желающие могли наблюдать за звёздами с помощью мощной подзорной трубы. Это новшество в значительной степени увеличило объём продаж москвичам биноклей и подзорных труб. Также фирма изготовила в подарок императору Николаю I модель пушки единорог. Государь был восхищен этой моделью, вручил Федору Борисовичу бриллиантовый перстень с рубином и заказал изготовление таких же моделей для всех кадетских корпусов Санкт-Петербурга и Москвы. Кстати, эти способы продвижения своих товаров успешно применялись в дальнейшем преемником Ф. Швабе. Благодаря проводимой рекламной и выставочной работе магазин Ф. Швабе на Кузнецком Мосту стал местом, куда люди приходили не только для того, чтобы улучшить зрение или что-то приобрести, но и для того, чтобы познакомиться с передовыми изобретениями того времени. Интересно отметить, что улица Кузнецкий Мост, где располагалась фирма «Ф. Швабе», стала первой улицей в Москве, где было опробовано освещение газовыми фонарями.

Ещё одно нововведение заключалось в том, что с 1849 года Федор Швабе начинает ставить клеймо на своих изделиях. Это повысило узнаваемость изготовленной им продукции и позволило развернуть активную продажу инструментов частным лицам, государственным учреждениям и учебным заведениям. Так, с 1854 года фирма «Ф. Швабе» стала поставщиком Императорского Казанского университета и Московского

кадетского корпуса. Чуть позже она становится крупнейшим поставщиком оптических и физических приборов Двора Его Императорского Величества. С конца 70-х годов по заказу московского департамента полиции фирма освоила выпуск комплектов антропометрических инструментов для обмера преступников по методу А. Бертильона и начала поставлять их в полицейские участки.



Рисунок 2. Клеймо фирмы «Ф. Швабе»

Фирма практиковала индивидуальную работу с клиентами. Так, в магазин часто приходили хирурги, стоматологи, ортопеды и просили изготовить для них те или иные инструменты, которые сложно было получить из-за рубежа. Это также поднимало престиж фирмы и повышало уважение к её владельцу.

Важно отметить, что компания целенаправленно занималась пропагандой научных знаний. В качестве примера можно привести вступительную статью в каталоге микроскопов, посвящённую биографии и творческому пути физика-оптика Э. Аббе (Ernest Abbe), компаньона Карла Цейса [4]. Кроме того, своё оборудование предприятие снабжало подробной инструкцией по эксплуатации, а также быстро ремонтировало прибор, пришедший в негодность [5]. Для привлечения большего количества заказов компания предоставляла дополнительные услуги: доставка товаров по Москве была бесплатной, в другие города изделия отправлялись по почте за счёт предприятия. Пос-

тоянным клиентам каталоги продукции рассылались бесплатно, упаковка инструментов делалась за счёт фирмы.

Благодаря принятым мерам компания очень быстро развивалась, а следовательно, росла и номенклатура производства. Чтобы познакомить покупателей со своей продукцией, Федор Борисович в 1856 году издаёт свой первый каталог на русском и немецком языках, содержащий описания и технические характеристики выпускаемых оптических приборов. В 1867 году свет увидел второй каталог – «Полный систематический каталог физических, механических, оптических, медицинских и других инструментов и снарядов». В дальнейшем выпускаемые каталоги стали иллюстрировать рисунками, а их выпуск стал традиционным, причём кроме больших и общих каталогов выпускались каталоги по специальностям. К сожалению, нам не удалось найти первые каталоги фирмы, поэтому мы приводим копии титульных листов каталогов начала XX в., с которыми мы и работали (рисунок 3).

В 1870 году фирма «Ф. Швабе» приступила к изготовлению новых хирургических инструментов, допускающих их антисептическую обработку. В конце десятилетия фирма выходит со своими наборами инструментов на зарубежный рынок, где успешно конкурирует с западными производителями. Расширение номенклатуры производимой продукции привело к увеличению объёмов производства, что, в свою очередь, потребовало открытия дополнительных магазинов. Были открыты филиалы в Нижнем Новгороде и Киеве.

Управление производством и реализацией продукции требовало большого напряжения сил, и Федор Борисович принимает решение о привлечении к этой работе своего племянника – Альберта Ивановича



Рисунок 3. Титульные листы каталогов фирмы «Ф. Швабе» начала XX в.

ча Гамбургера. Для этого компания в 1873 году преобразовывается в торговый дом «Ф. Швабе», учредителями которого стали Ф. Б. Швабе и А. И. Гамбургер. Всё это привело к качественному рывку в развитии компании. Она значительно расширила ассортимент выпускаемых товаров, улучшила их качество, вышла на новые рынки сбыта, развила сотрудничество с ведущими западными фирмами и заняла высокое место в ряду компаний, выпускающих аналогичную продукцию. В 1880 году Федор Швабе в возрасте 66 лет выходит из торгового дома и передаёт свои права на фирму «Ф. Швабе» А. И. Гамбургеру, который на протяжении последующих 30 лет продолжал работу, начатую основателем компании, не меняя, что очень важно, первоначального её названия. В результате этой работы в Сокольниках была построена фабрика по изготовлению и ремонту медицинских инструментов, медицинского оборудования и оптических приборов. Фабрика была оснащена новыми машинами, станками и орудиями производства. Станки работали на электричестве, вырабатываемом собственной электростанцией, имелись водопровод, газовый генератор (газ получали из бензина), хорошая вентиляция. На фабрике были организованы научный отдел, инженерно-конструкторское бюро, отдел контроля качества оптических приборов, цех сборки геодезических приборов, большой склад сырья и готовой продукции, отдел комплектации и упаковки заказов. Слаженно действовали механическая мастерская, мастерские по изготовлению хирургических инструментов, кузница, паяльная, полировочная, малярная, отделение делительных машин с прессами для вырубки деталей из металла, стеклодувная мастерская, отдел по изготовлению изделий из стекла, столярная мастерская [6–8]. Торговый дом «Ф. Швабе» проработал до 31 августа 1917 года. В Советской России он был преобразован в акционерное общество «Геофизика», существующее до настоящего времени. Но это уже другая история.

Для того чтобы понять размах работы компании «Ф. Швабе» по производству только медицинского инструмента, перевязочных средств, приборов и оборудования в конце XIX – начале XX вв., приводим список разделов, присутствующих в каталоге медицинских изделий 1901 г., в котором представлены 18136 наименований продукции на 846 сдвоенных страницах. А ведь были ещё каталоги по механике, химии и технологии, по волшебным фонарям, геодезии, микроскопии, метеорологии.

Указатель каталога по отделам.

Анатомия	Антропология и антропометрия
Обстановка для хирургических и больничных палат	Инструменты и аппараты для лечения болезней дыхательных путей
Анестезия	Иньекции и аспирация

Инструменты для кровопускания	Зубные инструменты
Офтальмология	Отология
Ринология	Ларингология
Полость рта и нёба	Инструменты для бронхов и пищевода
Инструменты для желудка	Инструменты для операций in anali
Урология	Дерматология и трансплантация
Инструменты в карманных наборах	Наложение шва и остановка кровотечения
Ампутация, резекция, трепанация	Акушерство и гинекология
Термокаустика	Дезинфекция и стерилизация
Диагностика	Принадлежности для ухода за больными
Аппараты для гидротерапии и термотерапии	Аппараты для питания и гигиены
Массаж и лечебная гимнастика	Электродиагностика и электротерапия
Бандажи и бинты	Протезы
Ортопедия	Перевязочный материал
Аптечные принадлежности	

Перечень аптечных принадлежностей в этом каталоге состоит из 915 наименований. В него входят весы (ручные, тарирные, аптекарские и др.), разновесы (от фунтовой гири до разновеса в сантиграмм), ложки (фарфоровые, металлические), шпатели, ножи, пилюльные машинки, прессы, резаки для травы, ступки (фарфоровые и металлические), фарфоровые и стеклянные выпарительные чашки, стеклянная посуда (стаканы, колбы круглодонные и плоскодонные, мерные цилиндры с делениями на налив и слив, мерные стаканы – стеклянные и фарфоровые, склянки, банки, мензурки различных типов и размеров – прозрачные и из оранжевого стекла, с корковой или притёртой стеклянной пробкой, делительные воронки, эксикаторы, водяные бани, воронки, пробирки различных форм и размеров, пипетки, бюретки), штативы, испарители, газовые горелки, инфундирки, кастрюли, перегонные аппараты из стекла и металла на газовом и дровяном нагреве, щипцы, ножницы, зажимы, различные держатели, карандаши по стеклу, алмазные резаки, пробки (корковые и резиновые), сетки, керосиновые, бензиновые и спиртовые лампы, спиртовки, газовые горелки разной конструкции, резиновые трубки, фильтры. И всё это, как видно, из различного материала, всевозможных размеров и конструкций.

Вот, например, как описываются в каталоге обычные ручные весы (рисунок 4): весы ручные с медными коромыслами и роговыми чашками, с длиной коромысла 9–10–11–12 см, для груза 2–5–10–15 г, диаметром чашки 3–3,5–4–4,5 см, лакированные или никелированные, пяти типов и размеров по коромыслу, диа-

Акционерное Общество Ф. Швабе, Москва. Кузнецкий м., д. кн. Жолыцка.

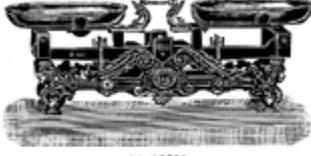
XXXV. АПТЕЧНЫЕ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ.



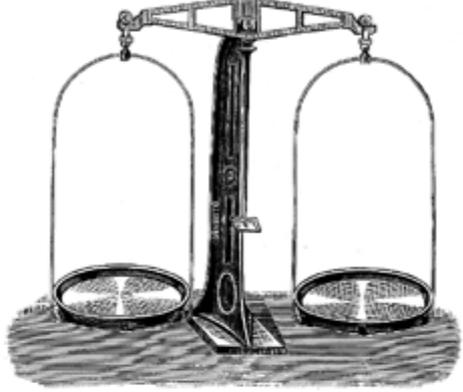
№ 16600



№ 16904.



№ 16906.



№ 16610.

В ъ с ы.		Р.	К.	№	Р.	К.
16600*	19625*	Вѣсы ручные съ мѣднѣи коромыслами и роговыми чашками. Лучшій сортъ. Длина коромысла 9 10 11 12 с/м. Для груза 2 5 10 15 грам. Диаметръ чашки 3 3½ 4 4½ с/м. а) Лакрированные . Цена, Р. 1.50 1.75 2.— 2.25 б) Никелированные . » » 1.65 1.90 2.15 2.35 Длина коромысла 13 15 17 19 с/м. Для груза 20 30 50 100 грам. Диаметръ чашки 5 6 7 8 с/м. а) Лакрированные . Цена, Р. 2.50 2.75 3.— 3.25 б) Никелированные . » » 2.65 3.— 3.25 3.40 Длина коромысла 22 25 27 30 с/м. Для груза 200 300 400 500 грам. Диаметръ чашки 9 10 12 13½ с/м. а) Лакрированные . Цена, Р. 3.50 3.75 4.— 4.50 б) Никелированные . » » 3.60 3.90 4.40 5.—				
16604*	19629*	Стойка для ручныхъ вѣсовъ 1 —				
16606*	19627*	Вѣсы системы Беранже, съ 2 круглыми чашками Для груза 1 2 3 5 кг. а) Цена съ клеймомъ . Р. 7.— 7.50 9.50 11.50 б) Цена безъ клейма . » 5.50 6.50 8.25 9.50 Для груза 10 15 20 кг. а) Цена съ клеймомъ . Р. 13.— 16.— 19.— б) Цена безъ клейма . » 11.— 14.— 17.—				
16610*		Вѣсы тарирные, на желѣзной лакрированной повстанкѣ, съ мѣднѣи коромыслами и чашками, со скалкой для арротировки: Для груза 0,5 1 3 5 10 15 20 кг. а) Лакр. Цена Р. 13.50 14.50 16.— 17.50 21.— 25.— 30.— б) Никел. » » 15.— 16.— 18.— 22.— 25.— 30.— 35.—				

Рисунок 4. Страница 451 каталога аптечных принадлежностей фирмы «Ф. Швабе»

метру чашек и массе груза, на подставке или нет. Дополнительно могут разделяться по качеству и цвету ниток – шёлк зелёного цвета, нитка бумажная белая.

Из представленного описания видно, что при желании, зайдя в магазин торгового дома «Ф. Швабе», можно было полноценно оснастить и больницу, и аптеку, и химическую лабораторию. Недостаёт только реактивов и фармацевтических субстанций. А этим занимались другие люди – драгисты.

ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬ Н. ЗАКЛИН

Примером работы такого драгиста может служить деятельность провизора Н. Заклина (г. Санкт-Петербург). К сожалению, какой-либо информации о его жизни в открытой печати нам найти не удалось. Однако анализ содержания каталога аптекарских, резиновых и хирургических товаров провизора Н. Заклина позволил получить представление о работе аптекарского склада конца XIX в. [9].

Во введении провизор Н. Заклин пишет: «Цель издания настоящего каталога состоит в том, чтобы дать возможность покупателям заодно с резиновыми, клеёнчатыми и виксантиновыми изделиями запастись необходимыми аптекарскими, хозяйственными, косметическими товарами, находящимися в складах моего магазина и отпускающимися весьма добросовестно по самым умеренным ценам». Далее он добавляет, что в этот каталог вошла только наиболее ходовая часть товаров. Поскольку перечислить все товары, входящие в каталог, не представляется возможным, ниже мы приводим разделы каталога, а также их количественное наполнение.

Анализ перечня лекарственного растительного сырья, химических веществ минеральной и органической природы показал, что он способен не только обеспечить работу аптеки, но и гарантировать функционирование средней химической лаборатории, занимающейся химическим синтезом и физико-химическим анализом.

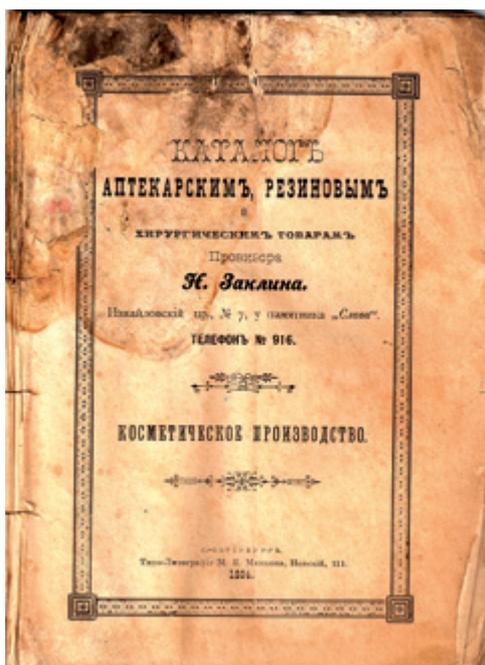


Рисунок 5. Копия первой страницы «Каталога аптекарским, резиновым и хирургическим товарам» провизора Н. Заклина

Таблица 1.

Разделы каталога Н. Заклина

№№	Разделы каталога	Количество товарных позиций
1.	Предметы для кухни, стола и пряности	65
2.	Предметы для хозяйства и домашнего обихода	30
3.	Чернила	6
4.	Средства против насекомых	16
5.	Вещества для чистки домашней утвари и выведения пятен	15
6.	Порошок для чистки серебра	4
7.	Аптекарский и химический товар Лекарственное растительное сырьё Неорганические и органические вещества Готовые именные средства Масла жирные Масла эфирные Мёд и продукты пчеловодства Скипидар, канифоль, терпентин Бальзам Другие Итого	124 105 11 6 11 3 6 2 16 284
8.	Продукты для аптек и фабрик Химические Эфирные эссенции Ягоды Итого	20 10 6 36
9.	Патентованные готовые средства	50
10.	Натуральные минеральные воды	73
11.	Соли для ванн и для питья	31

№№	Разделы каталога	Количество товарных позиций
12.	Искусственные минеральные и прохладительные воды	13
13.	Целебные воды	45
14.	Предметы ухода за больными детьми и перевязочный материал	107
15.	Курительные вещества	19
16.	Дезинфекционные и дератизационные вещества	34
17.	Губки, щётки	9
18.	Гребни, гребешки, пульверизаторы	7
19.	Материал для стирки белья	26
20.	Осветительный материал	20
21.	Иллюминация и украшение ёлок	8
22.	Материал для приготовления фейерверка	25
23.	Нюхательная соль	4
24.	Вещества, употребляемые для курения	23
25.	Курительницы	7
26.	Принадлежности для туалета	33
27.	Предметы для дезодорации	3
28.	Косметика – ограничили лишь перечислением видов изделий [помада, фиксатуар, бриллиантин, масло для волос, воды для волос, краска для волос, мыла туалетные (отечественные и заграничные – английские, немецкие), мыла медицинские, одеколоны, туалетная вода, туалетный уксус, воды и молочко для смягчения кожи, крема, пудра для лица и волос, румяна, белила, карандаши, духи (французские, английские, на вес), средства для зубов, зубная паста, душистые подушки]	–
29.	Клеёнчатый отдел [клеёнка, салфетки, платки, половые ковры и дорожки, клеёнка половая (линолеум)].	–
30.	Непромокаемая одежда викантинная (мужские, женские, военные накидки, с капюшоном и без, пальто, куртки, брюки, армяки кучерские, передники, нагрудники для врачей и сестёр милосердия)	–
31.	Резиновый отдел (калоши, игрушки, куклы, подушки и матрацы, чепцы для купания, одежды, спасательные кольца и жилеты, чехлы для ружей, фляжки, грелки, половики, ковры, спринцовки, молокоотсосы, пузыри для льда, подушки для кислорода и воздуха, материал для постельных подкладок). Предметы из розговой резины [стаканы, трости, подсвечники, кисеты, чехлы, кольца, мыльницы, рукоупражнители (эспандеры), саквояжи, портфели, сумки, платёжные тарелки, подставки, мешки, ленты]	–
32.	Предметы для конюшни, экипажей и велосипедов	–

Таким образом, на складе у провизора Н. Заклина находились около одной тысячи складских позиций аптечных, гигиенических и хозяйственных товаров. Косметические товары, изделия из клеёнки и резины, средства по уходу за больными и образцы непромокаемой одежды подсчитать просто невозможно. Необходимо также учесть, что всё это хранилось на складе не в одном экземпляре, а мешками, коробами, бочками, рулонами. Дополнительно надо принять во внимание, что для их хранения были необходимы различные температурные условия и уровни влажности. Невозможно даже представить, каких размеров должен был быть склад для хранения такого количества таких разных товаров. Для оптимального функционирования описанного склада был необходим персонал, обладающий специальными знаниями, квалификацией и опытом. Сотрудники должны были не только правильно оформлять отпуск крупнооптовых заказов потребителям, рационально упаковав их и определив на доставку, но и вести контроль сроков хранения товаров, а также своевременно пополнять складские запасы. Таким образом, чем шире была складская номенклатура и разнообразнее перечень продуктов на складе, тем большая ответственность ложилась на управляющих и администраторов и тем более высокие требования предъявлялись к сотрудникам такого склада и его помещениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведённые в статье в историческом аспекте сведения о деятельности, без которой трудно представить себе прогресс в естественных науках, в том числе медицине, должны быть, на наш взгляд, полезны современному читателю. Действительно, два человека – Ф. Б. Швабе и Н. Заклин, предприниматель и фармацевт, также ставший предпринимателем, – более века назад чрезвычайно успешно приложили свои усилия к созданию материального оснащения различных отраслей естествознания. Они проявили незаурядные организаторские способности, развивались сами и способствовали эффективному развитию тех дисциплин, которые нуждались в обеспечении необходимым оборудованием, выполняя при этом и определённые просветительские функции. Проявленные Ф. Б. Швабе и Н. Заклиным деловые качества и принципы организации возглавляемых ими предприятий не утратили актуальности и могут быть применены и в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА

1. Люди Русской науки. Очерки о выдающихся деятелях естествознания и техники / Предисловие и вступительная статья акад. С. И. Вавилова; составитель и редлактор И. В. Кузнецов. М.-Л., ОГИЗ, Гос. изд. технико-теоретической литературы. 1948. 1195 с. [Lyudi Russkoi nauki. Ocherki o vydayushchikhsya deyatelyakh estestvoznaniya i tekhniki. Predislovie i vstupitel'naya stat'ya akad. S. I. Vavilov / Sostavitel' i redlaktor I. V. Kuznetsov. M.-L., OGIZ, Gos. izd. Tekhniko-teoreticheskoi literatury. [People of Russian science. Essays on outstanding figures in science and technology. Foreword and introductory article by acad. S. I. Vavilov / Composer and editor I. V. Kuznetsov. M.-L., OGIZ, Gos. ed. Technical and theoretical literature.] 1948. 1195 p.]
2. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия. Изд. 2-е, перераб. и доп. Т. 1. – М., Медицина, 1976. 480 с. [Melent'eva G. A. Farmatsevticheskaya khimiya. Izd. 2-e. prerab. i dop. [Pharmaceutical chemistry. Ed. 2nd. prepared and add.] T. 1. M., Meditsina, 1976. 480 p.]
3. Муравьев И. А. Технология лекарств. Изд. 2-е, перераб. и доп. М., Медицина, 1971. 752 с. [Murav'ev I. A. Tekhnologiya lekarstv. Izd. 2-e, pererab. i dop.] [Technology of medicines. Ed. 2nd prepared and add.] M., Meditsina, 1971. 752 p.]
4. Иллюстрированный каталог микроскопов и принадлежностей для микроскопических работ «Ф. Швабе». № 2., М., 1905. 108 с. [Ilyustrirovannyi katalog mikroskopov i prinadlezhnostei dlya mikroskopicheskikh работ «F. Shvabe». [Illustrated catalog of microscopes and accessories for microscopic works «F. Schwabe».] № 2. M., 1905. 108 p.]
5. Новейшие бактериологические аппараты / Каталог. М., 1900. 12 с. [Noveishie bakteriologicheskije apparaty. Katalog. [The newest bacteriological apparatus. Catalog.] M., 1900. 12 p.]
6. История компании «Швабе». [Istoriya of company Shvabe. [History of Schwabe.] Available at: http://shvabe.com/about/history_more/ (accessed 10.06.2018).
7. История фирмы «Ф. Швабе». [Istoriya firmy "F. Shvabe". [History of the firm "F. Shwabe".] Available at: <https://toptigki.livejournal.com/18255.html> (accessed 10.06.2018).
8. Поставщикъ Двора Его Императорского Величества. [Postavshchik" Dvora Ego Imperatorskogo Velichestva. [Supplier of the Court of His Imperial Majesty.] Available at: <http://optic10.narod.ru/Shvabe.htm> (accessed 10.06.2018).
9. Каталог аптекарским, резиновым и хирургическим товарам провизора Н. Заклина. С.-Петербург, 1894. 116 с. [Katalog aptekarskim, rezinovým i khirurgicheskim tovaram provizora N. Zaklina. [Catalog of pharmacy, rubber and surgical products from the pharmacist N. Zaklin.] S.-Peterburg, 1894. 116 p.]



БЕЛГОРОДСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА

БЕЛЭКСПОЦЕНТР

7 - 9 ноября 2018

XXI межрегиональная
специализированная
выставка



МЕДИЦИНА ФАРМАЦИЯ

В рамках выставки:
работа “Территории здоровья”,
консультации специалистов

ВКК “БЕЛЭКСПОЦЕНТР”, г. Белгород, ул. Победы, 147 А

Т./ф.: (4722) 58-29-40, 58-29-65, 58-29-41

E-mail: belexpo@mail.ru, www.belexpocentr.ru

РЕЦЕНЗИЯ НА МОНОГРАФИЮ АВТОРОВ

А. И. Мараховой, А. А. Сорокиной, В. Ю. Жилкиной

«ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ НА РАСТИТЕЛЬНОЙ ОСНОВЕ»

К препаратам из лекарственного растительного сырья (ЛРС) в России особое отношение, и использование трав было традиционным еще с XI века. В настоящее время количество фитопрепаратов в России увеличивается с каждым годом и сейчас составляет более 40% номенклатуры лекарственных средств, выпускаемых в нашей стране.

Широкий спектр фармакологической активности, меньшее количество побочных эффектов по сравнению с синтетическими средствами обуславливают популярность растительных препаратов.

В настоящее время лекарственные средства, в том числе лекарственное растительное сырье (ЛРС), включены в список продукции, подлежащей обязательной сертификации и должны подвергаться контролю качества.

Качество лекарственных средств зависит не только от строгого соблюдения технологического регламента их производства, но и от применения надежных аналитических методов контроля и оценки качества фармацевтических субстанций (ЛРС) и готовой продукции – лекарственных растительных препаратов. Постоянное повышение уровня требований к качеству лекарственных средств, разработка современной фармакопеи требуют пересмотра ряда методик количественного анализа ЛРС. При этом новые методики должны быть точными и не приводить к большому росту себестоимости анализа. Наиболее подходящими для этих целей являются фотометрические и потенциометрические методы.

Несмотря на то, что в литературе достаточно много внимания уделяется разработке методик анализа отдельных видов ЛРС, требуется реализация систематического подхода к методологии выбора способа анализа в зависимости от влияния сопутствующих веществ.

Отсутствие систематических исследований в области химической стандартизации в цепочке «ЛРС – лекарственная форма – лекарственный препарат» с учетом состава метаболома растения обуславливает актуальность рецензируемой книги.

В рецензируемой монографии описаны возможности некоторых физических и физико-химических методов, применяемых в количественном определении биологически активных соединений ЛРС и препаратов на его основе.

В монографии приведены примеры использования некоторых физических и физико-химических методов для стандартизации ЛРС и препаратов на его основе. Описаны теоретические основы гравиметрического, титриметрического (в том числе и потенциометрического), спектрофотометрического анализа биологически активных соединений.

Данная информация может быть весьма полезна в практике молодых исследователей и работников производств.

Особой ценностью монографии является приведенная в ней методология, позволяющая сделать выбор в пользу того или иного метода анализа, сформулированная на основе результатов собственных исследований и примеров научной литературы. Данная методология позволит начинающим исследователям выстроить структуру собственных исследований, а производителям ЛРС – избежать ошибок при разработке нормативной документации предприятия.

Представленная книга может быть полезна производителям ЛРС, дипломникам, аспирантам и докторантам фармацевтических вузов, научным работникам.

Директор ИБХТН РУДН д.х.н.



Я.М. Станишенский

Ректификационная система BuchiGlasUster со склада в Москве

Установка периодической ректификации BuchiGlasUster в комплектации «под ключ» доступна со склада в Москве. При необходимости в комплект поставки может быть включен термостат и вакуумный насос со склада.



РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ:

- Взрывозащищенное исполнение.
- Диапазон рабочих температур: -60...+200С
- Диапазон рабочих давлений: -1...+0,5 бар
- Материалы в контакте со средой:
 - боросиликатное стекло 3.3.
 - PTFE
 - эмаль белого и синего цвета

КОМПЛЕКТАЦИЯ:

Кубовая ёмкость рабочим объёмом 15 л из эмалированной стали, имеет рубашку с резьбовыми адаптерами M16*1 для подключения циркуляционного термостата, обогреваемая часть снабжена теплоизоляцией в стальном кожухе.

Куполообразная крышка сосуда из стекла.

Система перемешивания для равномерного кипения смеси в кубе с двойным уплотнением из PTFE-колец на подшипниках качения, не требующим смазки и отвечающим требованиям FDA.


Скидка*
15%
Промокод:
phct



*При предъявлении промокода покупателю предоставляется скидка в размере 15%. Количество товаров, участвующих в акции, ограничено. Подробности акции просьба уточнять у эксклюзивного дистрибьютора BuchiGlasUster на территории РФ:



ТРИ ПОДХОДА К РАЗРАБОТКЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ: КОНТРАКТНЫЙ, САМОСТОЯТЕЛЬНЫЙ И КОМБИНИРОВАННЫЙ

АВТОР

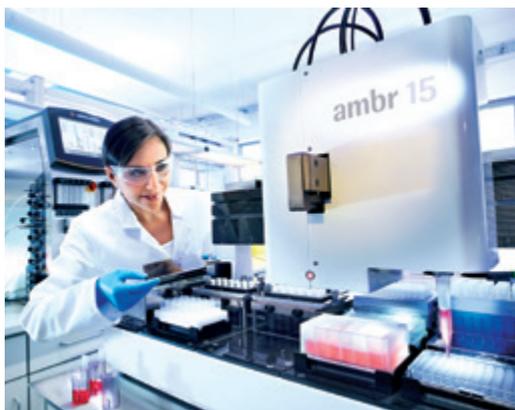
П. Л. Гнеденков,

ООО «Сарториус Стедим РУС»

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время такая группа лекарственных препаратов, как моноклональные антитела, становится все более и более востребованной в медицине. Сегодня из 10 самых продаваемых препаратов в мире 8 являются моноклональными антителами. Более того, на различных этапах регистрации и разработки находятся еще десятки препаратов, а количество патентов, описывающих терапевтическое использование моноклональных антител, исчисляется тысячами. Это не могло не привлечь к этой группе препаратов внимание различных фармпроизводителей: от гигантов фармацевтического бизнеса до небольших стартапов.

На сегодняшний день существует несколько подходов к разработке процессов получения и очистки моноклональных антител: некоторые компании предлагают проведение контрактных исследований, некоторые проводят такие исследования самостоятельно, а некоторые используют комбинированный подход, привлекая внутренние и внешние ресурсы. При этом каждый из подходов имеет свои преимущества. Самостоятельные исследования позволяют оперативно модифицировать схемы и дополнительно получать материалы для проведения научных изысканий, однако требуют наличия специалистов и оборудования прямо на месте. Поскольку стоимость современных аналитических систем часто оказывается очень значительной, подобный подход оправдывает себя только в случае, когда исследовательская база уже существует или если планируется разработка множества продуктов. Дополнительные сложности возникают при выборе экспрессионной системы – хозяина. Самостоятельная разработка системы может занять очень значительное время, притом возможно, что с точки зрения индустриализации полученная система окажется неидеальной – ведь она должна сочетать хороший рост, высокий титр и генетическую стабильность с высокой механической устойчивостью. Разработка и тестирование подобной системы может занять несколько лет, что не всегда целесообразно для осуществления одиночных проектов. С другой стороны, большинство коммерческих систем высокой эффективности для исследовательских целей доступны по сравни-



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

тельно низкой цене, однако лицензии на коммерческое использование могут стоить значительно дороже и часто подразумевают выплату роялти. Использование контрактных разработчиков позволяет избежать значительной части этих проблем: они, как правило, уже имеют опыт разработки и лицензирования клеточных линий (а часто и владеют правами на какие-либо промышленные линии) и располагают всем оборудованием, необходимым для проведения исследований и характеристики препарата. Однако при использовании контрактных исследований возникает другая проблема – стоимость работы исследователей обычно выше, чем при самостоятельной разработке, а после успешного завершения требуется провести трансфер технологии на производственную площадку клиента, при этом, как правило, возникает парадоксальная ситуация: чем лучше разработан процесс в лаборатории, тем сложнее его перенести на уже существующую площадку. Решением подобных проблем может быть создание производства под конкретный препарат уже после окончания разработки, однако в данном случае все упирается в жесткие временные рамки.

ПЛАТФОРМА CELLCA ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ CHO

Комбинированные решения, использующие преимущества обоих подходов, позволяют обойти многие сложности: ограниченный объем проводимых сторонней организацией исследований позволяет минимизировать затраты на их проведение, сохраняя сжатые временные рамки, а индустриализация процесса на месте позволяет выполнить масштабирование и валидацию в конкретных условиях будущего производства.

Так, можно использовать сервис разработки компании Cellca (ныне часть концерна «Сарториус») по созданию биоаналогов. Достаточно выбрать оригинальную молекулу и составить общий план дейст-

вий – все остальное сделают контрактные исследователи. Поставленный на поток процесс разработки биоаналогов (в настоящее время завершено более 20 проектов) позволяет в кратчайшие сроки, до 4 месяцев, получить несколько готовых клонов – продуцентов с эффективностью не менее 3 г/л моноклональных антител. При этом, несмотря на то что каждый клон индивидуален, большой опыт работы с ними позволяет дать общие рекомендации и провести первичное культивирование в объеме до 5 л, то есть начать масштабирование процесса сразу же после получения клонов. Параллельно с процессом масштабирования можно начинать процесс регистрации и стандартизации препарата также силами контрактных исследователей. Например, для этого можно воспользоваться услугами компании Biooutsource – одного из лидеров в области исследований биоаналогов. Стандартный набор исследований, предлагаемых этой компанией, позволяет доказать биоаналогичность исследуемого препарата, а следовательно – использовать специальные схемы сертификации, применяемые для биоаналогов. Помимо этого, можно также охарактеризовать и клон – продуцент, доказать его достаточную генетическую стабильность и вирусную чистоту, таким образом подготовив почву для его регистрации в качестве промышленного продуцента, а по окончании этих исследований создать под заказ абсолютно гомогенный банк клеток (МСВ) на 500 криопробирок и отгрузить его заказчику. Параллельно с этими исследованиями на базе предполагаемого производства можно проводить исследования по масштабированию и очистке: комплексные решения на базе одно-разовых технологий позволяют в кратчайшие сроки исследовать разные варианты процесса, охарактеризовать их, собрать и обработать полученные данные с целью построения области допустимых параметров и оптимизации процесса, а в дальнейшем легко перенести процесс в производство и обеспечить контроль критических параметров в реальном времени.



Рисунок 1. Платформа Cellca для экспрессии белков в клетках CHO



ЗДОРОВЫЙ ВОЗДУХ ДЛЯ БОЛЬНИЦ

Материал предоставлен
компанией «Поток Интер»

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение современных стандартов безопасности требует использования эффективных технологий обеззараживания воздуха в медицинских учреждениях. На пути их внедрения стоят два препятствия: отсутствие опыта проектирования и солидный возраст многих больничных зданий, ограничивающий возможности модернизации. Однако оба барьера преодолимы. Ревизия проектной базы нового строительства и применение автономных решений там, где радикальная модернизация невозможна, позволяют в обозримые сроки привести любой стационар в соответствующее современным требованиям состояние.

Ежегодно в российских стационарах от внутрибольничных инфекций страдает порядка 2,5 млн человек. Бытует мнение, что инфицирующая пациентов патогенная микрофлора распространяется исключительно контактным способом. Однако мало кто обращает внимание на воздушно-капельный путь распространения инфекций, хотя он представляет серьезную опасность. Одна из главных тому причин – несоответствие зданий стационаров и амбулаторий современным санитарным требованиям к чистоте воздуха.

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТАРУЮ ПРОБЛЕМУ

По мнению кандидата медицинских наук **Владимира Кулабухова**, заведующего отделением анестезиологии и реанимации Ожогового центра ФГБУ «Институт хирургии имени А. В. Вишневского», ИСМП (случаи инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи) – основная причина летальности в стационарах всего мира. Согласно статистике, они повышают риск летального исхода для пациентов в 5–7 раз, продлевают их пребывание в больницах в среднем на 6–8 дней и наносят ежегодный ущерб бюджету в размере 15 млрд рублей. При этом стандартные профилактические меры (дезинфекция помещений и оборудования, контроль за соблю-



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

дением санитарных правил персоналом, ограничение доступа посетителей) не создают барьер основному способу распространения патогенной микрофлоры – по воздуху. По данным ВОЗ, на долю передающихся воздушно-капельным путем инфекций приходится более 90% всех регистрируемых заболеваний, и ИСМП не являются исключением.

Такие традиционные способы обеззараживания воздуха, как ультрафиолетовое облучение, обработка озоном или химически активными веществами, имеют невысокую эффективность. Во-первых, ввиду избирательности воздействия на патогенную микрофлору, во-вторых, из-за своей опасности для человека, что делает невозможным их непрерывное использование, в том числе в присутствии пациентов и персонала. Что касается применения HEPA-фильтров, то они не убивают патогенные микроорганизмы, а лишь аккумулируют их, в результате чего сами могут стать источником повышенной биологической опасности.

Однако существуют современные технологии, позволяющие системно решить проблему. Так, метод инактивации патогенных микроорганизмов путем комбинированного многократного воздействия постоянными электрическими полями, разработанный российской научно-производственной фирмой «Поток Интер», позволяет эффективно уничтожать все известные микроорганизмы.

«Инактивация микроорганизмов происходит при прохождении воздушного потока через активный элемент установки и приводит к необратимому повреждению микробных клеток, после чего разрушенные микроорганизмы улавливаются в зоне фильтрации. Таким образом, обеспечивается надежная микробиологическая очистка воздуха, исключающая накопление живых патогенов в фильтрующей части установки. При этом она может работать в круглосуточном режиме в присутствии людей, без каких-либо противопоказаний», – объясняет кандидат биологических наук **Евгений Кобзев**, заведующий лабораторией НПФ «Поток Интер», эксперт в области микробиологии воздуха.

Свою эффективность метод доказал в ходе клинико-эпидемиологических исследований, которые проводились на базе ряда ведущих российских медицинских институтов. Так, обеззараживание воздуха с применением установок «Поток» в госпитале им. Н. Н. Бурденко позволило в 1,4 раза снизить вероятность развития послеоперационного сепсиса, в 2,2 раза – септического шока и полиорганной недостаточности и вчетверо снизить летальность, обусловленную послеоперационными осложнениями. Кроме того, оборудование «Поток», встроенное в систему вентиляции, уже более десяти лет обеспечивает чистоту воздуха в операционных и реанимационных залах пятого хирургического корпуса Клинической больницы № 1 им. Н.И. Пирогова. На протяжении всего этого периода уровни обсемененности воздушной

среды в данных помещениях находятся в пределах соответствующих требований санитарно-эпидемиологических правил, доля послеоперационных осложнений не превышает 0,15%.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОЕКТОВ

Использование подобных описанному современным методам очистки воздуха от биологически активных микроорганизмов с эффективностью не менее 95% является обязательным стандартом для проектирования зданий медицинских учреждений. В течение последнего десятилетия в России приняты стандарты и нормативы, которые кардинальным образом изменили требования к очистке и дезинфекции воздуха в чистых помещениях (ГОСТ 52539-2006, ФЗ № 384-ФЗ, СанПиН 2.1.3.2630-10, СП 118.13330.2012, СП 158.13330.2014). Однако на практике это условие зачастую не выполняется.

«Но их практическое применение требует пересмотра большинства существующих проектов, многие из которых либо начали разрабатываться в предшествующий период, либо по инерции включают устаревший подход к проектированию систем вентиляции и очистки воздуха», – комментирует **Иван Шалаев**, генеральный директор компании «ПроектАльянсСтрой», специализирующейся на проектировании внутренних инженерных сетей для медицинских учреждений.

Например, внедрение канальных систем обеззараживания воздуха «Поток» в уже спроектированную систему вентиляции требует ревизии проектных решений. Дело в том, что внутреннее сопротивление функционального элемента системы составляет 150 Па, что в 3–5 раз выше сопротивления вентиляционных решеток, которое изначально учитывалось при проектировании. Поэтому простая установка канальных модулей в систему вентиляции приведет к резкому снижению кратности воздухообмена в обслуживаемых помещениях и скорости потока в воздуховодах, что в итоге фактически сводит эффект обеззараживания на нет. Чтобы система работала, необходимо увеличивать свободный напор в сети и повышать производительность воздухообмена здания в целом. Реализация подобных мер требует привлечения высококвалифицированных специалистов и разработки оригинальных проектных решений с последующей комплексной модернизацией системы воздухообмена.

На сегодняшний день положение усугубляет дефицит компетентных проектировщиков, обладающих необходимой квалификацией. Многочисленные ошибки в аэродинамических расчетах, при подборе вентиляционного оборудования, непонимание основных правил перераспределения воздушных потоков в сети – все это в итоге ведет к выбору неоптимальных и экономически необоснованных проектных концепций. Причиной всему – низкий уровень вузовской подготовки специалистов. Большинство из них обучается

по устаревшим программам и до начала своей профессиональной деятельности не имеет опыта работы на стройках, где применяется современное оборудование и материалы.

«Это лишь часть возможных проблем, которая видна на поверхности. Готовые проекты с трудом поддаются адаптации к новым условиям. Внедрение в них решений по обеззараживанию воздуха подчас требует значительных внеплановых затрат, например обусловленных необходимостью замены вентиляционного оборудования на более производительное, пересчета сечений основных магистралей и замены воздухопроводов, их перекладки по более оптимальным направлениям, а также согласования со смежными инженерными коммуникациями. Поэтому самый рациональный шаг – с самого начала проектировать системы с обеззараживанием воздуха в чистых помещениях и, конечно, полностью отказаться от устаревших типовых проектных решений. В числе прочего это относится и к различного рода типовым проектам поликлиник, больничных корпусов, родильных домов и т.п.», – резюмирует **Иван Шалаев**.

ЛОКАЛИЗОВАННЫЕ РЕШЕНИЯ

Еще больше проблем возникает в процессе модернизации зданий старой постройки, в которых размещается значительная часть эксплуатируемых больниц и поликлиник. По факту до 80% действующих стационаров и амбулаторных учреждений эксплуатируются с нарушением санитарных норм в части обеззараживания воздуха. Однако попытки привести их в соответствие с актуальными требованиями путем реконструкции далеко не всегда приносят плоды.

Многие постройки относятся либо к советскому периоду, либо даже к более раннему, а порой им вообще присваивают статус исторических. Далеко не всегда эти здания соответствуют архитектурным и конструктивным требованиям и нормам, предъявляемым сегодня к медицинским учреждениям. Ведь еще 20–30 лет назад нормативы не содержали четких указаний по классу чистоты и кратности воздухообмена, а также по зонированию чистых помещений. К тому же редко в каком старом здании можно найти техническое помещение необходимых габаритов для размещения современного вентиляционного оборудования, ведь раньше вентиляции уделялось не так много внимания, как в наши дни. До сих пор для большинства медицинских учреждений областных городов понятие «чистый воздух» является отвлеченным. Операционные отделения, инфекционные боксы, реанимационные палаты в них функционируют с нарушением всех существующих норм и требований, касающихся чистоты воздуха.

По мнению **Ивана Шалаева**, выход из подобных ситуаций следует искать не в перестройке здания, что не всегда возможно и требует значительных капиталъ-

ных затрат, а в использовании локализованных решений, которые могут быть реализованы в пределах каждого отдельного помещения.

«Все изделия «Поток» имеют масштабируемую модульную структуру. На основе базового активного функционального элемента «Поток 150-М-01» собираются как канальные установки производительностью от 90 до 2880 м³/ч, так и автономные модули различной мощности. Например, мобильный агрегат на базе одного активного элемента способен за час обработать воздух в стандартном помещении площадью 40–50 м². Самый производительный вариант реализации – потолочная циркуляционно-канальная установка для высокоасептических операционных. Воздухораспределитель установки создает однонаправленные воздушные потоки, имеющие скорость 0,24–0,3 м/с и отсекающие рабочую область от окружающего пространства. Получается своего рода асептический купол, создающий преграду для проникновения микроорганизмов в стерильную операционную. После чего вытесненный воздух забирается установкой с периферии помещения», – объясняет специалист.

Необходимую скорость однонаправленного потока воздуха обеспечивает статическое давление, поддерживаемое во входных и выходных камерах активных модулей, а также использование индивидуальных перфораций в зависимости от исходных данных по требуемому воздухообмену для помещения. Производительность различных модификаций установки может варьироваться в пределах от 1800 до 7200 м³/ч при площади поперечного сечения однонаправленного потока воздуха 11 м² и энергопотреблении в пределах от 40 до 80 Вт. Аналогичные решения, но меньшей производительности и габаритов, выпускаются для малых операционных (540–2160 м³/ч) и палат группы 2 по ГОСТ Р 52539-2006 (270–900 м³/ч). В прочих случаях могут применяться подвесные ламинарные ячейки «Поток» разной производительности, а также подвесные и колонные рециркуляционные модули различного назначения.

«Все эти решения могут быть использованы автономно и потому не требуют реконструкции здания и модернизации системы вентиляции. В случае если речь идет об очень старых постройках, применение установок позволяет не только предотвратить распространение внутрибольничных инфекций, но и нейтрализовать неблагоприятный микробиологический фон в зданиях. Известно, что эффективность дезинфекции стен и перекрытий в старых постройках крайне низка, поскольку микроорганизмы (в особенности плесневые грибы) способны проникать вглубь строительных материалов и переживать там неблагоприятные условия. Постоянное обеззараживание позволяет значительно сократить их концентрацию в воздухе и препятствует последующему распространению», – добавляет **Евгений Кобзев** («Поток Интер»).



ЭКОНОМИЧНЫЙ И ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ СОЗДАНИЯ ЧИСТОЙ ВОЗДУШНОЙ СРЕДЫ

Материал предоставлен
компанией Lamsystems

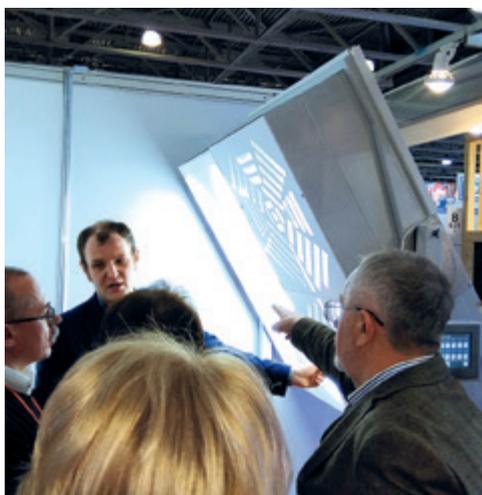
ВВЕДЕНИЕ

В связи с развитием высоких технологий в различных отраслях промышленности все более увеличивается перечень требований к стабильно обеспеченному качеству воздушной среды в производственных помещениях. Параметры, характеризующие качество воздушной среды помещений, могут быть самыми разнообразными: температура, влажность, давление, чистота, и все они продиктованы особенностями технологических процессов конкретного производства.

Как показывает мировая практика, наибольшие требования предъявляются именно к чистоте воздушной среды – по концентрации взвешенных частиц в единице объема воздуха и по максимально допустимому количеству жизнеспособных микроорганизмов в единице объема воздуха. Для стабильного обеспечения указанных параметров невозможно применение обычных строительных вентиляционных систем, стандартных инженерных решений. Все это приводит к необходимости создания специальных инженерных сооружений – **комплексов чистых помещений**. Чтобы создать чистое помещение заданного класса чистоты, необходимо четко понимать, что само по себе чистое помещение не является гарантом обеспечения нужной чистоты воздушной среды. Достижение заданного класса чистоты обеспечивается только комплексным подходом к закладываемым техническим и проектным решениям с самого начала работ, а также соблюдением требований, специфичных для каждого из этапов создания чистых помещений. Понятно, что при таком подходе стоимость комплексов чистых помещений хоть и оправданно, но все-таки высока.

ЧИСТЫЕ ЗОНЫ

В поиске более экономичных, но не менее эффективных способов достижения требуемого класса чистоты воздуха в определенном объеме, специалисты научились создавать автономные локальные пространственные конструкции, так называемые, **чистые зоны**. Как и чистые помещения, их «меньшие братья» являются продуктом индивидуального



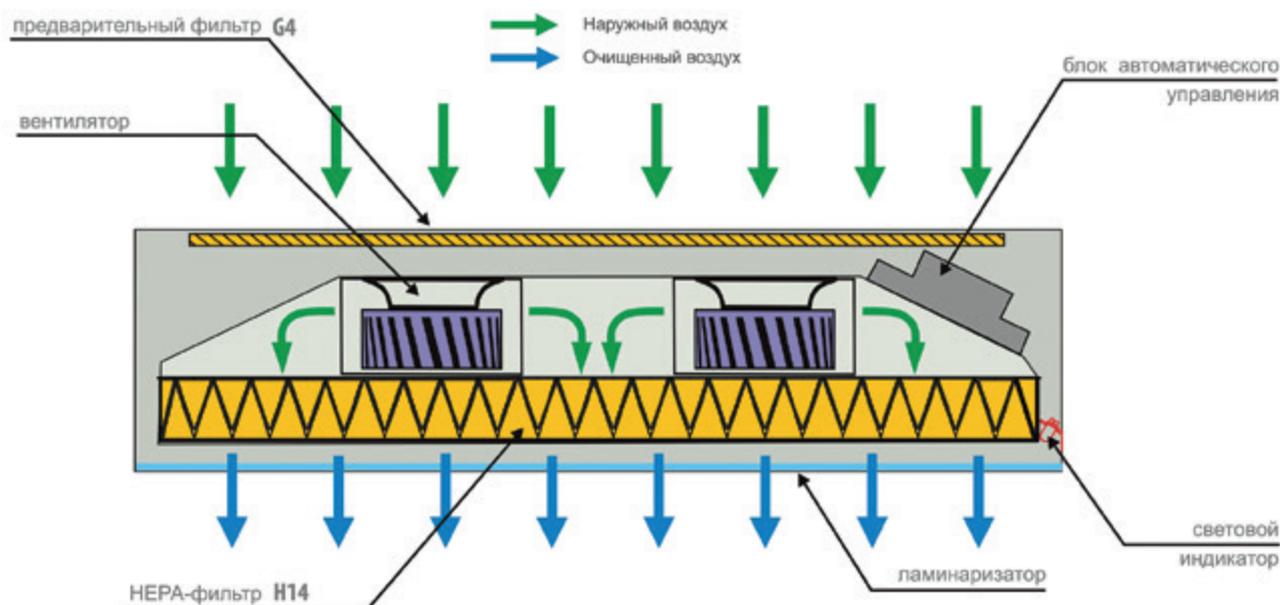


Рисунок 1. Схема воздушных потоков фильтромодулей

проектирования, поскольку конфигурация, класс чистоты и габариты чистой зоны зависят от конкретного помещения, специфики технологического процесса и размещаемого в рабочем пространстве оборудования. Стоимость чистой зоны гораздо ниже стоимости чистого помещения. Именно поэтому чистые зоны сегодня пользуются огромным спросом. Это, в свою очередь, породило большое количество предпринимателей, производящих нерабочие конструкции за счет экономии на материалах и технологиях.

АВТОНОМНЫЕ ФИЛЬТРОВЕНТИЛЯЦИОННЫЕ МОДУЛИ

Инженерная мысль, следуя рыночным запросам на недорогие, но эффективные решения, привела специалистов ЗАО «Ламинарные системы» к созданию **автономных активных фильтровентиляционных модулей** (далее – ФВМ). Автономные ФВМ являются, пожалуй, наиболее экономичным на сегодняшний день вариантом создания локальных зон более высокого класса чистоты в помещениях, имеющих более низкий класс чистоты, либо в неклассифицируемых помещениях.

В зависимости от комплектации ФВМ используется для создания разных типов нисходящего воздушного потока в рабочей зоне:

- ламинарного (при установке ламинаризатора) – для создания и поддержания высокой степени чистоты воздуха;
- турбулентного (при установке турбулизатора) – для равномерного распределения чистого воздуха по всему объему помещения.

Управление автономным ФВМ осуществляется с помощью сенсорного экрана, на котором отображается техническая информация о состоянии ФВМ, рабочих режимах и настройках. Конструкция позволяет объединять между собой несколько ФВМ, формируя ламинарное поле. С помощью сенсорного экрана может осуществляться настройка и контроль текущих параметров работы 16 фильтромодулей одновременно.

Каждый ФВМ оснащен двумя вентиляторами с ЕС-моторами, предварительным фильтром G4, фильтром тонкой очистки HEPA класса H14, портами для подачи аэрозоля и отбора проб, световыми индикаторами оперативного контроля режимов работы, а также блоком автоматического управления, обеспечивающим поддержание постоянной скорости воздушного потока на выходе из ФВМ без изменений независимо от засоренности фильтров. Для крепления фильтромодулей к потолку, ограждающим конструкциям или между собой предусмотрены универсальные кронштейны. Опционально в фильтромодуль с ламинаризатором может быть интегрировано светодиодное освещение.

ФВМ могут быть изготовлены из стали, окрашенной порошковой эмалью, либо из нержавеющей стали.

Впервые автономные ФВМ производства ЗАО «Ламинарные системы» были представлены на выставке «Pharmtech & Ingredients – 2017» в Москве, где вызвали большой интерес посетителей.

Автономные активные фильтровентиляционные модули марки LAMSYSTEMS – это экономичное и эффективное решение для любых производств и лабораторий различного профиля, где предъявляются определенные требования к чистоте воздушной среды.



МОНИТОРИНГ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИШЕНЬ ПРИ ИЗЫСКАНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: ПРИМЕНЕНИЕ WES ДЛЯ ТЕПЛООВОГО КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА

АВТОРЫ

M. Casás-Selves,

ведущий научный сотрудник,
Институт по исследованию рака,
Онтарио, Торонто, Канада

D. Ventro,

ведущий научный сотрудник,
ProteinSimple, Сан-Хосе,
Калифорния, США

S. Harrison Uy,

ведущий научный сотрудник,
ProteinSimple, Сан-Хосе,
Калифорния, США

ВВЕДЕНИЕ

При изыскании новых лекарственных веществ чрезвычайно важным этапом процесса разработки препарата является подтверждение его связывания с целевым участком внутри клетки-мишени. Подтверждение того, что кандидат в лекарственные препараты воздействует на предполагаемую мишень, находящуюся в клетке, а также определение концентрации, при которой он оказывает желаемый эффект(ы), являются основными критериями оценки его активности и эффективности воздействия на ткани-мишени. Анализы теплового сдвига (TSA) регулярно применяются как в промышленности, так и в науке для выявления или подтверждения взаимодействий, происходящих при использовании очищенных белков. Не так давно этот тип анализа был адаптирован к цитологическому формату и получил название теплового клеточного анализа (CETSA) [1]. Важно отметить, что при переходе от биохимической системы к клеточной биологическая значимость сохраняется. Таким образом, локализация белка, посттрансляционные модификации и другие биомолекулярные перекрестные взаимодействия в процессе анализа на связывание лекарственного средства с мишенью остаются нетронутыми [1, 2].

ТЕПЛОЙ КЛЕТОЧНЫЙ АНАЛИЗ (CETSA)

CETSA предоставляет исследователям возможность измерения степени воздействия лекарственного средства на мишень непосредственно в клетке [2]. Обычно используемые фенотипические анализы, которые полагаются на результаты функциональных изменений, таких как изменение уровня метаболитов, статус фосфорилирования нисходящих белков-мишеней или жизнеспособность клеток в качестве мерил



реакции на лекарственное средство, не могут быть однозначно связаны именно с этим воздействием. Представляя собой метод прямой оценки взаимодействия лекарственных средств и мишеней, CETSA обладает большей специфичностью, ввиду измерения функциональной реакции на действие лекарственного средства.

Если говорить кратко, самый первый этап CETSA заключается в определении температуры, необходимой для денатурации представляющего интерес белка. После ее определения создаются условия, вызывающие постоянное тепловое напряжение. Это напряжение поддерживается в течение определенного периода времени для того, чтобы провести тестирование градиента концентрации предполагаемого лиганда на его эффективность в отношении определенной цели. Несвязанные белки денатурируют и осаждаются, тогда как связанные с лигандом белки остаются стабильными в растворе [2]. Стабилизированный белок может быть обнаружен в растворимой фракции, но для того чтобы исследователи могли получить достоверные данные, требуется применение количественного аналитического метода вестерн-блоттинга.

В данной статье представлены количественные и воспроизводимые данные CETSA, полученные с помощью прибора Wes™ (CETSA-Wes), производителем которого является компания ProteinSimple. Данный количественный анализ позволяет проверить связывание лекарственного средства с мишенью и, учитывая его количество, рассчитывает полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀).

CETSA И ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ WES

Доктор Matias Casás Selves является научным сотрудником Института по исследованию рака Онтаро (OICR). Он принимает участие в программе по изысканию новых лекарственных средств. Используя клеточную линию MV4-11, несущую клетки миеломоноцитарного лейкоза, исследовательская группа OICR поставила своей целью определить воздействие на мишень внутри клетки данной линии, которое производится запатентованным ими Соединением 1 (Compound 1). В качестве мишени был определен интересующий ученых Белок X (Protein X).

Протокол CETSA в первую очередь требует определения температуры денатурации белка-мишени [2]. Сначала клетки MV4-11 подверглись температурному воздействию в диапазоне от 37 °C до 72 °C, затем был сделан анализ экспрессии белка с применением традиционного вестерн-блоттинга. Было выявлено, что большая часть Белка X денатурировала и выпала в осадок при температуре 52 °C (результаты не показаны). Затем повышенные концентрации Соеди-

нения 1 (0,00001–10 мкМ) добавили к 2,5×10⁶ клеткам MV4-11 в каждом опыте на 1 час при температуре 52 °C, для контроля использовался растворитель ДМСО. Для измерения связывания Соединения 1 с Белком X клеточные лизаты анализировали с использованием обычной методики вестерн-блоттинга, определяя изменение экспрессии и устойчивости Белка X (рисунок 1). Соединение 1 индуцировало большой сдвиг устойчивости структуры Белка X под действием теплового напряжения между 0,001 мкМ и 0,01 мкМ (рисунок 1). Хотя эти результаты дают веские основания предполагать, что Соединение 1 связывается со своей мишенью в низком наномолярном диапазоне, точные значения IC₅₀ рассчитать невозможно, принимая во внимание полуколичественный характер обычного метода вестерн-блоттинга.

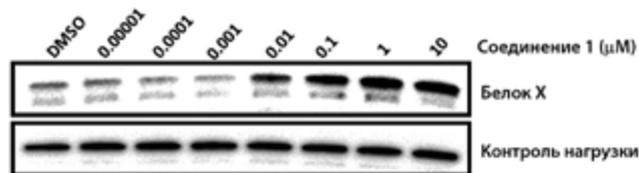


Рисунок 1. Определение проводилось методом иммуноблоттинга (вестерн-блот), было обнаружено увеличение экспрессии и стабильности Белка X в клетках MV4-11 при увеличении градиента концентрации Соединения 1. Эксперимент проводился при 52 °C. ДМСО, контроль растворителем

КАК РАБОТАЕТ WES

Wes – это полностью автоматизированная капиллярная система электрофореза, в которой применяется методика Simple Western (ProteinSimple, PN 004-600). В данной методике отсутствуют проблемы, присущие традиционным вестерн-системам, все процессы, начиная от разделения компонентов образца и заканчивая анализом данных, полностью автоматизированы. Образец лизата, матрицы разделения и концентрирования загружают в капилляр в вакууме, для разделения белков подается напряжение, а затем под действием УФ производится захват и иммобилизация молекул белка химическим методом.

Белок остается на стенке капилляра. Незахваченный материал смывается, и первичное антитело входит в капилляр, где образует специфичную связь с мишенью. Следующие этапы включают окисление люминола пероксидом в присутствии пероксидазы хрена (HRP). В результате этой реакции генерируется количественный хемилюминесцентный сигнал (рисунок 2).

Для разделения требуется всего 5 мкл денатурированного образца, который содержит лизат, 1X флуоресцентный стандарт, DTT и буфер для образца для каждой точки данных. Wes – это прибор, который способен за один цикл выполнять количественный анализ 25 образцов всего за три часа. При этом непо-

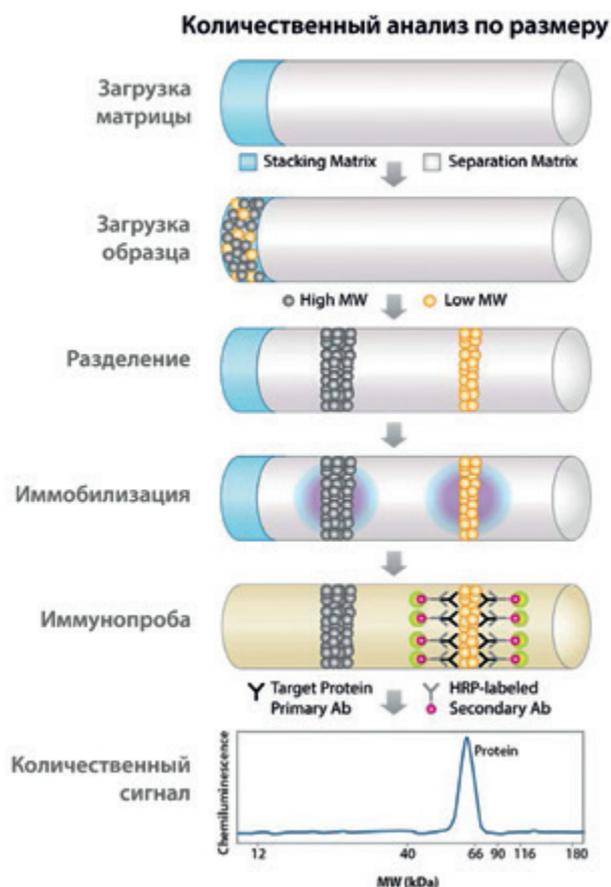


Рисунок 2. Стандартный анализ с использованием методики Simple Western, выполненный с помощью прибора Wes

средственная работа оператора займет всего 30 мин. Визуализация и анализ данных осуществляются с помощью программного обеспечения Compass, предназначенного для систем разделения белков Simple Western. Данные представлены либо в форме электрограммы, либо в виде традиционных полос.

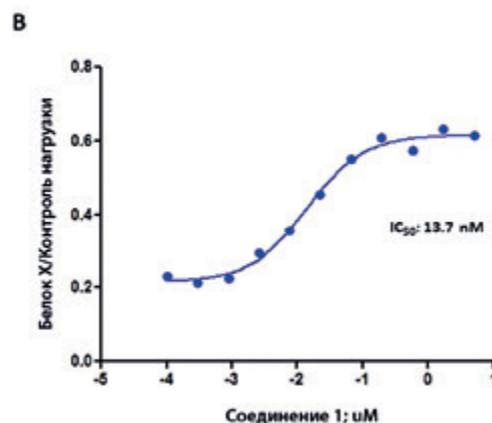
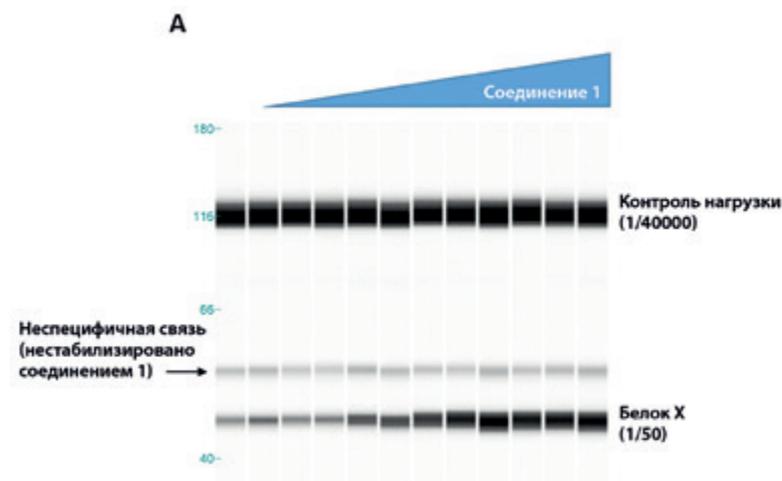


Рисунок 3. Повторение результатов при использовании системы CETSA-Wes. Они демонстрируют увеличение экспрессии и стабильности Белка X при увеличении концентрации Соединения 1 (А). Кривая зависимости «доза – эффект», сгенерированная для Соединения 1 на основе нормализации сигнала Белка X для контроля белковой нагрузки, $IC_{50}=13,7 \text{ нМ}$ (В)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ WES ДЛЯ МОНИТОРИНГА СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА В ПРОЦЕССЕ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Чтобы точно рассчитать значение IC_{50} для Соединения 1, результаты CETSA, полученные с помощью традиционной вестерн-методики (рисунок 1), были воспроизведены во время анализа с использованием прибора Wes. Здесь они представлены как CETSA-Wes. Повторный эксперимент проводили с использованием той же линии клеток лейкемии (MV4-11) с тем же количеством клеток на один опыт ($2,5 \times 10^6$), фиксированной температурой ($52 \text{ }^\circ\text{C}$) и временем (1 час). Но градиент концентрации Соединения 1 для составления изотермической кривой зависимости «доза – эффект», используемой для расчета IC_{50} , был расширен (рисунок 3А, В). При использовании системы CETSA-Wes можно было детектировать аналогичный сдвиг стабильности у Белка X в присутствии возрастающих концентраций Соединения 1 (рисунок 3А). Важно отметить, что Wes допускает мультиплексирование, если наблюдается достаточный разброс молекулярной массы белков-мишеней. Это позволяет детектировать и Белок X, и контроль нагрузки в одном капилляре.

Это дало точный метод нормализации сигнала, детектированного для Белка X, для контроля нагрузки и, следовательно, для вычисления IC_{50} для Соединения С.

Подсчет проводился с помощью ПО Compass для систем, основанных на методе Simple Western. Полученное значение составило $13,7 \text{ нМ}$, или $0,0137 \text{ мкМ}$ (рисунок 3В).

CETSA-WES ЯВЛЯЕТСЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫМ И ВОСПРОИЗВОДИМЫМ МЕТОДОМ

Было получено подтверждение возможности проведения количественного анализа с использованием метода Wes при выполнении теплового клеточного анализа CETSA. Затем с использованием данного метода была проведена валидация воспроизводимости результатов исследований. Эксперимент, отображенный на рисунке 3, был повторен с использованием идентичных условий, но в двух параллельных испытаниях. Ранее проведенные, независимые друг от друга анализы показали, что Соединение 2 является неактивным аналогом Соединения 1. Оно также было включено в исследование, чтобы продемонстрировать способность метода также дифференцировать молекулы, обладающие различной активностью (рисунок 4). Кривая зависимости «доза – эффект», для Соединения 1 была воспроизведена со сдвигом стабильности в Белке X, который был индуцирован аналогичной тепловой нагрузкой (52 °C), а рассчитанное значение IC_{50} составило 15,2 нМ (или 0,0152 мкМ) \pm 0,092 (рисунок 4). Важно, что неактивный аналог (Соединение 2) не оказывает влияния на Белок. Это подтверждает способность системы CETSA-Wes специфичным образом различать и точно измерять искомое, происходящее внутри клетки взаимодействие лекарственного препарата с мишенью.

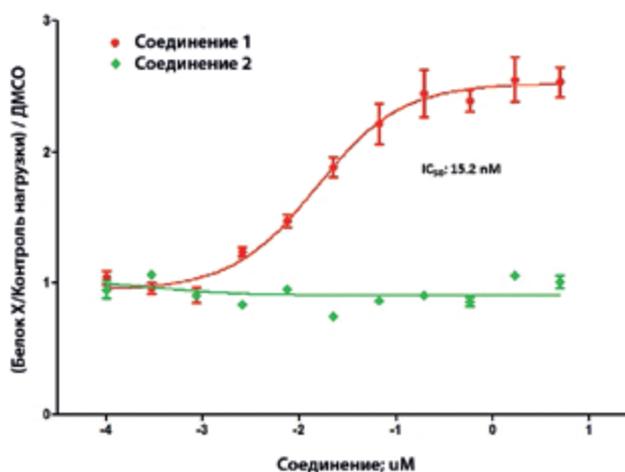


Рисунок 4. Кривая зависимости «доза – эффект», отображающая связывание Соединения 1 с целевым Белком X в сравнении с неактивным Соединением 2. Соединение 1, $IC_{50}=15,2\pm 0,092$ нМ; Соединение 2, IC_{50} = не определено

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новейших эффективных терапевтических средств часто ограничена в связи с невозможностью контролировать происходящее внутри клеток прямое связывание лекарственного вещества и белка-мишени. Анализ теплового сдвига (TSA) стал клас-

сическим средством для измерения взаимодействий между очищенными белками, а для мониторинга общей клеточной реакции на препарат применяются анализы, основанные на оценке фенотипической активности. Ни один из этих методов не позволяет производить прямое изучение взаимодействия лекарства и мишени внутри клетки, а также соотносить реакцию клеток с определенным взаимодействием лекарства и мишени. CETSA-Wes – это инновационный подход, который решает данную проблему благодаря своей способности назначать приоритет соединениям в рамках действий, предпринимаемых для оптимизации связи «структура – активность» (SAR). CETSA-Wes является усовершенствованным методом анализа воздействия на мишень, который позволяет ускорить процесс оптимизации химического соединения в SAR.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Martinez Molina D., Jafari R., Ignatushchenko M., Seki T., Larsson E.A., Dan C., Sreekumar L., Cao Y., Nordlund P.* Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay // *Science*. 2013. № 341. P. 84–87.
2. *Jafari R., Almqvist H., Axelsson H., Ignatushchenko M., Lundbäck T., Nordlund P., Martinez Molina D.* The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells // *Nature Protocols*. 2014. № 9. P. 2100–2122.





ИНЕРТНАЯ АЗОТНАЯ СРЕДА И БЕЗОПАСНОСТЬ ЦЕНТРИФУГ

Материал предоставлен
компанией Rousselet Robatel

ВВЕДЕНИЕ

23 марта 1994 г. была выдана директива 34/9/ES Европарламента и Совета ЕС по гармонизации законов государств – членов ЕС, касающихся «оборудования и защитных систем, предназначенных для использования в потенциально взрывоопасных средах».

Данная директива действовала вплоть до директивы 94/9/ЕС «Новый подход» от 1 июня 2003 г., название которой происходит от французского термина **«ATmosphere Explosible»** («взрывчатые атмосферы») – **ATEX**. 18.04.2014 на основе новой законодательной базы New Legislation Framework (NLF) данная директива была переработана в директиву **2014/34/EU**, которая 18.04.2016 полностью заменила изначальную директиву.

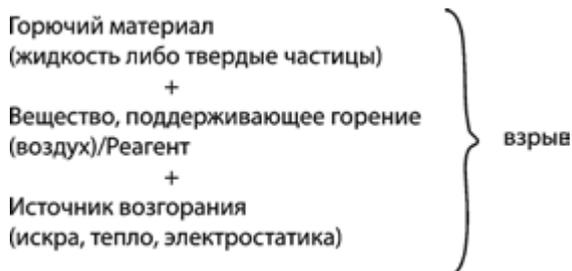
Применение электрооборудования на центрифугах в потенциально взрывоопасных средах определяет международный стандарт IEC 60079-0:2017. На территории Российской Федерации ему соответствует **ГОСТ 31610.0-2014** «Взрывоопасные среды. Часть 0. Оборудование. Общие требования».

Требования к неэлектрическому оборудованию для потенциально взрывоопасной среды регулируются **ISO 80079-36:2016** и ее российским вариантом – **ГОСТ 32407-2013** «Взрывоопасные среды. Часть 36. Неэлектрическое оборудование для взрывоопасных сред. Общие требования и методы испытаний».

О взрывозащитном исполнении непосредственно самих центрифуг и пойдет речь в статье, которую подготовили сотрудники компании ROUSSELET ROBATEL – L'Kherba и A. Ple-net.

ЗАЧЕМ НУЖНА ЦЕНТРИФУГА В ЗАЩИТНОЙ СРЕДЕ НЕЙТРАЛЬНОГО ИНЕРТНОГО ГАЗА?

При центрифугировании жидкостей и твёрдых частиц в химической и фармацевтической промышленности приходится часто иметь дело с потенциально взрывоопасными и легковоспламеняющимися материалами, которые при обработке в центрифуге образуют нестабильную среду при наличии следующих факторов:



Как видно из вышесказанного, мы имеем три фактора, образующих треугольник:



Для того чтобы исключить риск взрыва, необходимо изолировать или устранить один из этих факторов, а это не так просто, как может показаться на первый взгляд. Говоря о материале, мы имеем ввиду химические вещества, и тут стоит учитывать их взрывоопасность, но исключить их из процесса нельзя.

Таким образом, для исключения рисков взрыва и возгорания мы можем работать только с веществом, которое поддерживает горение и источником возгорания. Окислителем является кислород из окружающей среды. В центрифуге кислород присутствует до момента его вытеснения нейтральным газом, таким образом, газ полностью заполняет центрифугу, чаще всего для этого используется азот или углекислый газ.

Последним фактором является источник возгорания, например искра, тепло или статическое электричество, и для их устранения требуется использование электрооборудования во взрывозащищенном исполнении, а также заземление центрифуги. Таким образом мы исключаем третий фактор.

Примечание 1:

Стоит добавить, что мы говорим о минимизации риска возгорания из-за искры. Несмотря на то что моторы и элементы управления могут быть в защищенном исполнении, любой механический инцидент в центрифуге может спровоцировать возникновение искры.

Примечание 2:

Также нужно отметить тот факт, что заземление способствует безопасности оборудования только дополнительно, так как, например, в случае использования текстильного фильтрующего мешка в барабане проводимость барабана будет достаточно низкой, к тому же изменчивой в зависимости от плотностей перерабатываемых продуктов и т.д. Риск возникновения искр намного выше у центрифуг с нижней выгрузкой, у которых для удаления отфильтрованного осадка с внутренней стороны барабана и последующей его выгрузки используется вырезной нож, который контактирует с материалом. В процессе вырезания происходит контакт двух масс разного потенциала, что создает условия для возникновения опасной искры.

Рекомендация: в странах ЕС все производители центрифуг обязаны гарантировать, что оборудование было произведено таким образом, чтобы предотвратить возможное возникновение искр. Компания Rousselet создала следующие европейские рекомендации:

- ✓ Циркуляр TE номер 2174 от 18.01.1974.
- ✓ Стандарт ISO «Centrifugeuse, règle de construction et de sécurité».
- ✓ «Intégration de la sécurité dans la conception des machines et appareils» от 15.07.1980, рекомендуемые принципы безопасности 483 и R233-101.

Наиболее детально проработанным документом на данную тему является рекомендация от 2 июня 1982 года: «Etude des risques présentés par la centrifugation des suspensions dans un solvant inflammable» – «Исследование рисков при центрифугировании суспензий, содержащих горючие растворы».

Основные элементы описаны здесь (рисунок 2):

- a) газовая фаза, которая должна быть инертирована – % содержания $O_2 < 8\%$;
- b) непрерывный контроль инертных характеристик газовой фазы;
- c) если $\% O_2 < 8\%$
 - подача и запуск не должны начаться, если центрифуга остановлена;

- обеспечена сигнализация, и инертные характеристики газовой фазы находятся под постоянным контролем при работе центрифуги / потенциал заземления всех соприкасающихся частей и их контроль;
- d) перед вмешательством человека (человеческим фактором)
- предотвращение механических рисков;
 - обновление и контроль дыхательной атмосферы.

ТЕХНОЛОГИЯ АЗОТНОГО ИНЕРТИРОВАНИЯ

Азотное инертирование может быть использовано как на ручных, так и на автоматических центрифугах, но не стоит забывать, что тут речь идет о предотвращении взрыва, и поэтому контроль должен быть особенно тщательным. Ручной режим изображен на рисунке 1.



Рисунок 1. Ручной режим азотного инертирования

Подающий вентиль контролируется обслуживающим персоналом, поэтому должна соблюдаться строгая личная дисциплина ввиду потенциальной опасности взрыва.

По этой причине большинству компаний рекомендуется иметь автоматическую систему для минимизации потенциальной ошибки производственного персонала. Такая система постоянно контролирует и корректирует состояние путем сравнения с заданными параметрами и обеспечивает полную безопасность благодаря наблюдению за системой.

Какие существуют ограничения по безопасности у этих двух решений?

Азотная среда и контроль

В случае, если в процессе ожидается присутствие чужеродной среды, как потенциально взрывоопасного газа, рекомендуется придерживаться следующего плана спецификации оборудования для азотной инертной среды.

Контроль

Измерение и контроль газовой среды можно проводить двумя способами.

- ✓ Постоянный контроль % количества O_2 с помощью парамагнитного анализатора кислорода. Кислород O_2 является парамагнитным газом, который притягивается магнитным полем (так же как и железо). В этой системе анализируемый газ проходит через два полюса магнита и, таким образом, газ размещается в магнитном поле.
- ✓ Мобильный датчик настраивает уровень электрического тока пропорционально концентрации кислорода. Этот датчик не меняет своих характеристик со временем, но бывает очень чувствительным к коррозии из-за конденсационных паров, а также может попадать под влияние частиц пыли. Конкурентом данного типа детектора является система контроля с использованием газовых батарей. Тут детекция осуществляется с помощью газовой батареи, которая создает электрический сигнал, пропорциональный обнаруженному давлению O_2 . Данный метод детекции является точным, но имеет ограниченный срок действия, и, таким образом, нельзя построить всю систему безопасности на этом принципе без ее регулярных проверок.

Это означает, что для обоих анализаторов необходима автоматическая система проверки, которая будет наблюдать за состоянием и сигнализировать о снижении эффективности вследствие коррозии в первом случае или вследствие износа набора батареи во втором.



Рисунок 2. Измерение и контроль газовой среды путем измерения % O_2

Контроль сверхдавления – «вытесняющая» продувка.

Центрифуга имеет постоянный объем, и с помощью анализатора O_2 мы можем определить, каков будет нормальный расход для данного константного объема с учетом допустимых потерь установленно-

го давления для получения правильной концентрации O_2 .

Таким образом, когда стандартное значение известно, нужно только определить потенциально нужное количество азота анализатором O_2 .

Безопасность

Для эффективного контроля газовой среды нужно эту функцию объединить с циклом работы центрифуги, как это изображено на рисунке 3.

Данная система должна быть частью программируемого цикла прямо соединена, работать безукоризненно и иметь защиту от возможных вторжений или изменений на любом уровне.

Без применения данной системы мы подвергаемся опасности взрыва.

Как и при использовании данной системы, для обработки продукта при центрифугировании в инертной среде также необходимо иметь систему управления, которая вернет наш цикл в нормальную среду после окончания работы.



* Контроль анализатором O_2 или обеспечение сверхдавления.

Рисунок 3. Определение и контроль газовой среды с использованием инертного газа

Например, для центрифуг со съёмным фильтрующим мешком необходимо вмешательство оператора. Он должен наклониться над центрифугой при выемке мешка или при очистке барабана. Вдыхание инертного газа (N_2 или другого газа, например углекислого) провоцирует рвоту и потерю сознания, что, в свою очередь, может приводить к серьёзным последствиям для здоровья.

Похожий список строгих предписаний должен исполняться при наблюдении и поддержании приемлемого уровня среды, который позволяет открыть центрифугу.

Примечание: у центрифуг малого диаметра, например до 850 мм, полное обновление внутренней среды до атмосферы окружающей среды необязательно, поскольку количество инертного газа низкое и возможный выброс N_2 или других газов в окружающую среду не представляет никаких проблем.

СИСТЕМА АЗОТНОЙ ИНЕРТНОЙ СРЕДЫ ROUSSELET ROBATEL

На основании вышеизложенного становится понятно, насколько высоки требования к эффективной системе контроля. Специалисты компании Rousselet Robatel, которые работают в данной области на протяжении многих лет, разработали полную систему, которая была представлена 2 июня 1982.

Описание центрифуги

Центрифуга газонепроницаема для газа под давлением: рабочее давление – 20 миллибар, тестовое давление – 40 миллибар, допустимые потери давления – 200 нормальных литров в час.

Центрифуга имеет следующие элементы:

- надувную уплотняющую прокладку крышки центрифуги;
- корпус подшипника под давлением ($p=50$ миллибар);
- гидравлический сифон на выпускной трубке;
- надувное нижнее уплотнение контейнера для центрифуги с нижней выгрузкой с вырезанием.

Функционирование системы изображено на рисунке 4.



Рисунок 4. Схема функционирования центрифуги

Организационная схема

Устройство азотного инертирования было спроектировано как компактная единица, которую можно легко разместить на главной панели управления оборудованием (рисунок 5).

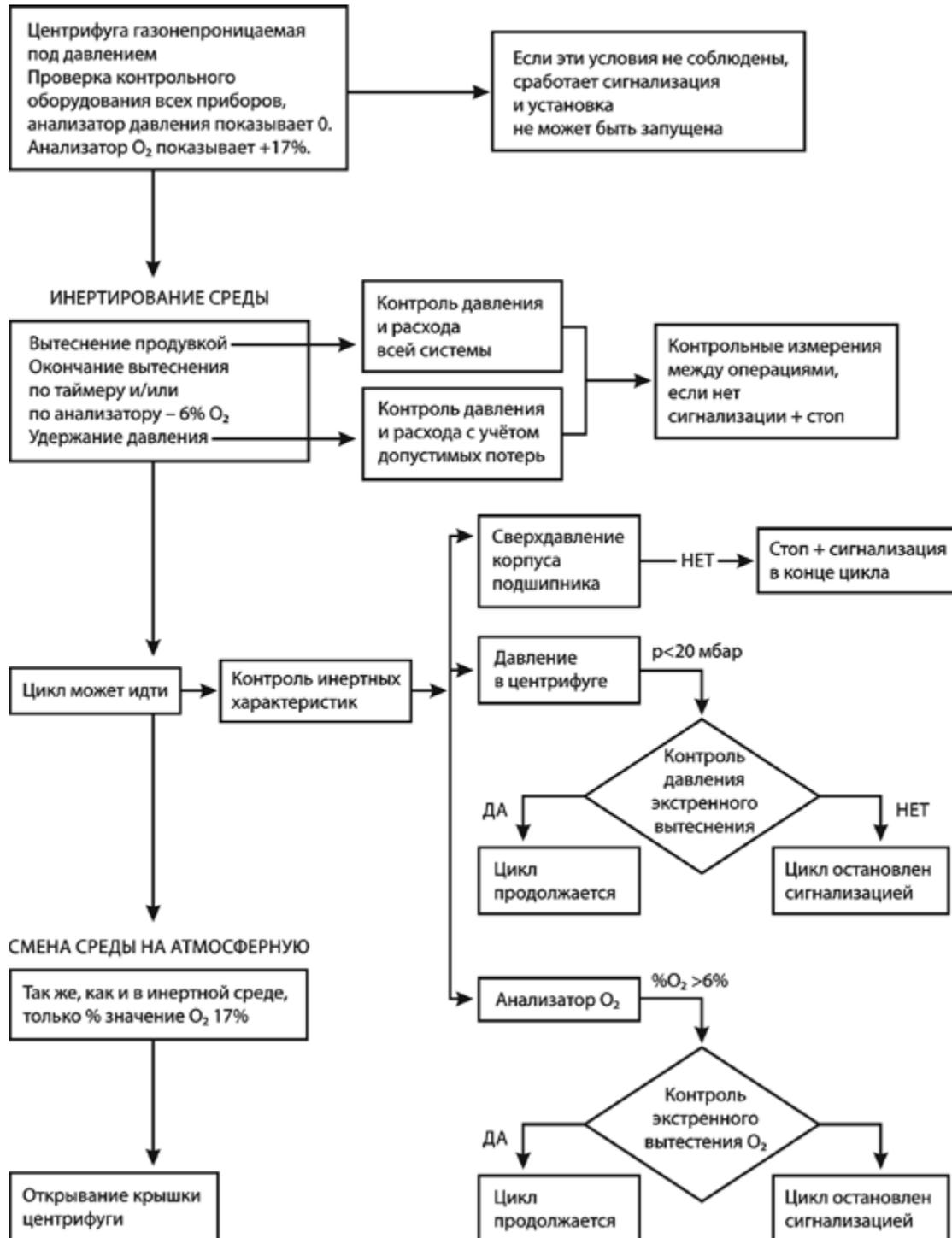


Рисунок 5. Рабочие условия





О.М.А.Р. НА МЕЖДУНАРОДНОЙ ВЫСТАВКЕ В ГЕРМАНИИ «АСЧЕМА-2018»

Материал предоставлен
компанией О.М.А.Р.

ВВЕДЕНИЕ

С 11 по 15 июня 2018 года представители компании О.М.А.Р. уже шестой раз подряд присутствовали на международной выставке «Асчема» в г. Франкфурт-на-Майне, Германия. Это превосходная возможность ознакомиться с последними достижениями в области машиностроения и биотехнологии, встретиться с партнерами и представить новую продукцию потенциальным клиентам.

В этом году компания О.М.А.Р. продемонстрировала четыре машины из одной линейки: блистерную машину для R&D-лабораторий Fantasy Plus, блистерную машину для упаковки в стрипы BF 35, блистерную машину BF 50 Plus и деблистерную машину F140. Все машины изготавливались с применением ряда серьезных технологических усовершенствований, чтобы клиенты компании О.М.А.Р. могли использовать весь потенциал современных научно-исследовательских и опытно-конструкторских разработок.

Техническая команда компании О.М.А.Р. наряду с глобальной сетью ее официальных представителей и дистрибьюторов, которая представлена в более чем 35 странах мира, оказывала поддержку клиентам и заказчикам на протяжении всего периода проведения выставки.



Исследования, инновации и дизайн стали ключевыми особенностями оборудования O.M.A.R. Все это позволило бренду O.M.A.R. занять уверенную позицию на современном фармацевтическом рынке, предоставляя покупателям большой выбор компактных решений для упаковки изделий в блистеры, а также для извлечения продуктов, упакованных в блистеры.

БЛИСТЕРНАЯ МАШИНА ДЛЯ R&D-ЛАБОРАТОРИЙ FANTASY PLUS

- ✓ Модель Fantasy Plus.
- ✓ Размер блистеров – 212x132x18 мм.
- ✓ Полуавтоматическая.
- ✓ Оснащена печатающим модулем.
- ✓ Программируемый логический контроллер Siemens (отвечает требованиям CFR21).
- ✓ Контрольная панель с сенсорным экраном.



Инновационная блистерная машина с удобным дизайном предназначена для изготовления высококачественных блистеров из предварительно нарезанных листов пластика и алюминия. Все операции, необходимые для упаковки продуктов в блистеры, выполняются легко и быстро на одной машине путем настройки и перестановки функционально связанных деталей без использования специального инструмента. Возможно изготовление оборудования в соответствии с определенными требованиями заказчика, используя изготовленные на заказ модули для изменения размеров, конфигурации и количества блистеров. Управление всеми функциями при производстве блистеров осуществляется через программируемый логический контроллер Siemens и контрольную панель с сенсорным экраном. Блистерная ма-

шина оснащена печатающим модулем для фиксации всех параметров, используемых при производстве блистеров.



шина оснащена печатающим модулем для фиксации всех параметров, используемых при производстве блистеров.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ БЛИСТЕРНАЯ МАШИНА ДЛЯ УПАКОВКИ В СТРИПЫ BF35

- ✓ Модель BF 35.
- ✓ Автоматическая блистерная машина для упаковки в стрип-пакеты.
- ✓ Размер блистров – 100x35 мм (или величина, кратная 35 мм).
- ✓ 35 уд/мин.



Модель BF35 – это совершенно новая, не имеющая аналогов установка для производства блистерных стрипов, оборудованная несколькими автоматизированными рабочими станциями. Машина позволяет изготавливать продукцию для клинических испытаний новых лекарственных средств, а также применяется для мелкосерийного производства. Машина отличается компактными размерами, а ее функционирование полностью автоматизировано. Система BF35 производит блистерную упаковку единого формата размером 100x35 мм. Таким образом, это наиболее эффективное решение для всех предприятий, работа которых связана с упаковкой твердой фармацевтической продукции, пищевых добавок и продуктов питания в блистеры. Путем простой перестановки модулей модель BF35 можно настроить таким образом, чтобы она производила блистерную упаковку для флаконов или бутылок, изготавливая небольшие контейнеры на одну или несколько доз с различным



положением. Более того, система BF35 позволяет получать блистеры для упаковки жидких веществ, предназначенных для использования в медицине и ветеринарии, с максимальной точностью дозировки.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ БЛИСТЕРНАЯ МАШИНА BF50 PLUS

- ✓ Модель BF 50 PLUS.
- ✓ Автоматическая блистерная машина.
- ✓ Размер блистеров – 180x100x27 мм.
- ✓ Предварительная установка для различных автоматических систем загрузки.
- ✓ Предварительная установка для системы видеуправления.



BF50 PLUS представляет собой компактную автоматическую блистерную машину, оснащенную подвижным фидером с вращающимися колесами. За управление фидером отвечает программируемый логический контроллер Siemens (соответствует нормативам CFR21). Предельная точность шага обеспечивается благодаря применению бесщёточного электродвигателя. Это многофункциональное решение для упаковки в блистеры твердых продуктов в промышленных масштабах. Машина позволяет быстро и эффективно упаковывать небольшие партии продукции в тех производствах, где требуется простота и гибкость применения.

Возможно дооснащение машины дополнительными модулями, такими как система выявления газовых пор, камера видеонаблюдения, устройство для нанесения меток по центру упаковки и др. Эта универсальность позволяет использовать модель для изготовления различных типов упаковки. Для подачи продукта могут применяться разные системы загрузки (от ручных до автоматических) благодаря применению специальных направляющих.



УНИВЕРСАЛЬНАЯ ДЕБЛИСТЕРНАЯ МАШИНА F140

- ✓ Модель F140.
- ✓ Универсальная модель.
- ✓ Деблистерная машина для извлечения упакованного продукта.
- ✓ 60–70 уд/мин.



Новая УНИВЕРСАЛЬНАЯ полуавтоматическая деблистерная машина Sympaty F140 – это устройство, предназначенное для извлечения твердых капсул, таблеток разной формы, мягких желатиновых капсул, леденцов и другой продукции из блистерной упаковки. В упаковке может быть до 7 рядов ячеек, а максимальная ширина блистера – 120 мм. Машина позволяет свести к минимуму затраты на изменение формата упаковки и хранение продукции. Оснащенная передвижной подставкой из нержавеющей стали и прозрачными подносами из ПЭТГ или нержавеющей стали AISI 316L для вторичного использования продукта или отходов производства, деблистерная машина F140 дополняется предохранительной решеткой, которую можно открыть вместе с системой крепления из поликарбоната. Фармацевтическая продукция извлекается без повреждения или загрязнения благодаря системе вращающихся лезвий, которой оснащена Sympaty F140. Перед извлечением продукции из упаковки осуществляется надрез алюминиевой пленки каждой отдельно взятой ячейки, обеспечивающий аккуратное извлечение продукции без нарушения ее целостности.

Машина может быть оснащена электронным счетчиком и регулятором движения для блистеров разных размеров и формы, например блистеров с диагонально расположенными ячейками.





ИННОВАЦИОННЫЙ, УНИВЕРСАЛЬНЫЙ РЕАКТОР ДЛЯ МЯГКИХ И ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С ТРЕМЯ МЕШАЛКАМИ НА КРЫШКЕ И ДОННЫМ ГОМОГЕНИЗАТОРОМ

Материал предоставлен
компанией «Промвит»



Механизм подъема крышки реактора

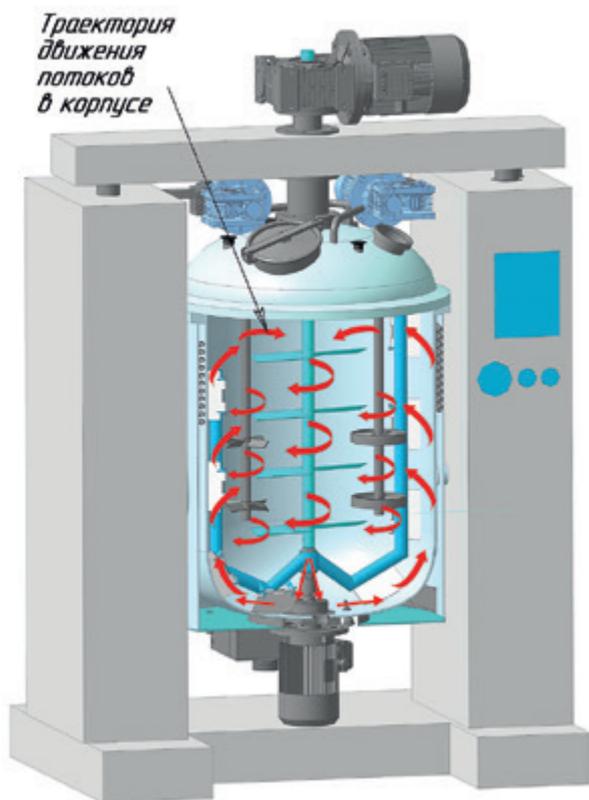
ВВЕДЕНИЕ

При заказе емкостного оборудования заказчики, как правило, стремятся заказать универсальный реактор с максимальным набором опций для решения индивидуальных технологических задач. Это оправданно при планировании производства широкой линейки продуктов в одном реакторе при небольших объемах серий и использовании реактора в контрактном производстве за счет его универсальности.

Характерным примером такого реактора может служить изготовленная в 2017 году инновационная разработка компании – реактор с рабочим объемом 300 л со встроенным донным роторным гомогенизатором и тремя размещенными на его крышке мешалками для приготовления мягких (эмульсий, гелей, мазей и паст) и жидких (растворов и суспензий) лекарственных форм. Корпус реактора изготовлен из стали AISI 316 L и рассчитан на работу под избыточным давлением 2 бар и вакуумом 0,9 бар.

Так как обычно цикл приготовления не превышает 2–3 часов, можно принять производительность данного реактора равной 600 литров в смену или 12000 л готового продукта в месяц при односменной работе.

Обычно реакторы заказывают для приготовления либо МЛФ, либо ЖЛФ. В данном случае благодаря своей оснащённости мешалками реактор получился широкоуниверсальным, что позволяет не только качественно приготовить обе лекарственные формы, но и использовать его в качестве плавителя для приготовления расплава жировой фазы МЛФ.



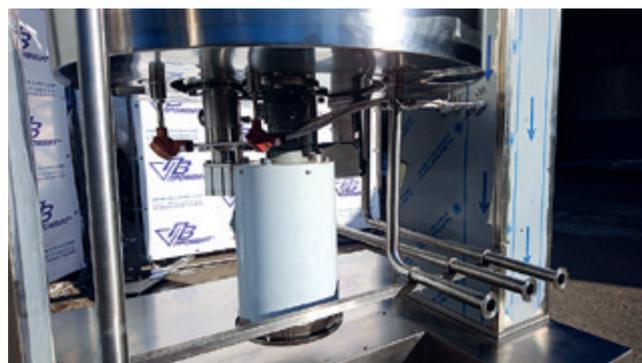
Реактор оборудован механизмом подъема крышки, что гарантирует контроль качества отмытки всех внутренних частей корпуса после приготовления каждой серии продукта и делает работу оператора максимально удобной.

По центру крышки размещена мешалка якорная тихоходная (обороты от 0 до 60 об/мин) с развитой поверхностью перемешивания и плавающими скребками из тефлона.

Справа и слева от оси якорной мешалки симметрично размещены две 2-х ярусные турбинные мешалки, которые, кроме своего прямого назначения в качестве мешалок, работают как классические рассекатели для увеличения эффективности работы якорной мешалки.



Тефлоновые скребки якорной мешалки



Привод гомогенизатора роторного

1-я турбинная мешалка имеет скорость вращения от 0 до 100 об/мин. В качестве рабочего органа выступают два съемных лопастных ротора открытого типа.

2-я турбинная мешалка имеет скорость вращения от 0 до 1000 об/мин. В качестве рабочего органа выступают два съемных лопастных ротора закрытого типа. Вместо нижнего ротора можно установить мешалку типа «фреза» для дополнительного измельчения сыпучих компонентов, загружаемых в реактор.

Механизм подъема крышки реактора позволяет оперативно обслужить все мешалки реактора и при необходимости заменить или сместить по валу верхние рабочие органы турбинных мешалок.

Уплотнение валов всех мешалок на крышке – двойное торцевое, герметичное, с автономным замкнутым контуром смазки и охлаждения.



Три мешалки с приводами на крышке реактора



Тихоходная якорная мешалка с плавающими скребками из тефлона; две быстроходные турбинные мешалки; якорь тихоходной мешалки с тефлоновыми скребками

Комплектация крышки реактора: люк технологический, клапан предохранительный, мановакуумметр, смотровое окно с дворником и фонарем подсветки, материальные штуцера и коллектор с тремя спрейболами.

Корпус оснащен 2-контурной винтовой теплообменной (один контур – для нагрева продукта подогретой водой, а второй – для охлаждения захлажденной водой) и теплоизолирующей рубашками.

Для выгрузки готового продукта и реализации опции ввода компонентов под слоем жидкости днище корпуса оснащено двумя вентилями нижнего спуска. Через 2-й вентиль можно организовать подачу компонентов продукта, используя возможность реактора работать под вакуумом.

Каждая мешалка выполняет свою задачу, а их комбинация, учитывая возможность регулировки положения рабочих органов по высоте, регулировки оборотов и направления вращения роторных мешалок позволяет настроить реактор, как музыкальный инструмент, на работу с каждым продуктом.

Якорная мешалка предназначена для перемешивания вязких жидкостей, сдвига подогретых компонентов продукта от стенок в сторону центра корпуса, где они попадает в зону действия роторных мешалок, которые направляют их к днищу, к роторному гомогенизатору. Этому же способствуют дополнительные лопасти на валу якорной мешалки, размещенные под углом 45 градусов, которые также направляют компоненты продукта к гомогенизатору.

Кроме того, при выгрузке готового продукта скребки якорной мешалки очищают стенки корпуса, сводя тем самым его потери к минимуму.

При работе реактора в качестве плавителя жировой фазы якорная мешалка производит перемешивание компонентов и очистку стенок корпуса, за счет чего ускоряется теплообмен и весь процесс плавления.

Турбинная мешалка с открытыми роторами перемешивает поступающие к ней от скребков якорной мешалки продукт и смещает их от поверхности к донной части реактора.

Основное назначение турбинной мешалки с закрытыми роторами – перемещение компонентов продукта от поверхности к донной части реактора и нагнетание их в корпус гомогенизатора для обеспечения его эффективной работы.

Плавная регулировка скорости вращения мешалок дает возможность привести параметр линейной скорости их рабочих органов в соответствие с широким диапазоном вязкости смешиваемых продуктов.

Назначение гомогенизатора – измельчение частиц эмульсии и суспензии и создание гомогенного продукта с дисперсностью от 10-ти до 50 мкм.



Быстроходная мешалка с двумя турбинами открытого типа скорость от 0 до 100 об/мин



Гомогенизатор роторный донного расположения, скорость ротора – от 0 до 3600 об/мин

При работе гомогенизатора в частицах продукта, направляемых в зазор между ротором и статором, создается давление, которое резко падает на границе зазора между ротором и статором при перемещении частиц между лопатками статора. При этом внутреннее давление приводит к разрушению частиц, тем самым уменьшая размер частиц и повышая дисперсность обрабатываемого продукта.

В верхней части своего корпуса работающий гомогенизатор создает зону разрежения, куда поступают компоненты приготавливаемого продукта. Затем они под воздействием насосного эффекта, создаваемого лопатками ротора, проходят сквозь лопатки ротора, пересекают зазор между ротором и статором и выходят между лопатками статора в донную часть корпуса реактора.

Здесь компоненты продукта снова подвергается воздействию лопаток якорной мешалки, и цикл повторяется.

Как показывает опыт изготовления и эксплуатации реакторов, для получения качественного продукта при производстве мягких лекарственных форм комплектация реактора гомогенизатором обязательна. Реактор может быть как с внутренним, так и внешним контуром циркуляции. Выбор конструкции реактора обычно выполняет технолог заказчика в зависимости от вида продуктов, которые предполагается готовить на данном реакторе.

В данном случае мы рассматриваем конструкцию реактора с внутренним контуром циркуляции и размещением гомогенизатора в донной части.

Пульт управления реактора оснащен панелью PLC с визуализацией технологического процесса, управлением всеми параметрами технологии и архивированием этих параметров в режиме реального времени.

Наличие панели PLC и контроллера позволяет полностью запрограммировать весь технологический процесс, начиная с загрузки компонентов и заканчивая выгрузкой готового продукта, что гарантирует стабильное качество получаемого продукта и исключение ошибок, которые могут быть допущены персоналом в случае ручного управления реактором.

На стадии разработки технического задания наши специалисты совместно с технологами заказчика определяют необходимый набор опций для того, чтобы реактор вписался в существующую технологическую схему. Система управления реактором так же строится таким образом, чтобы она вписалась в существующую систему управления технологическим оборудованием, а реактор максимально охватил спектр поставленных перед ним задач.

Емкостное оборудование, производимое компанией «Промвит», оснащается необходимым комплектом технической документации для дальнейшей аттестации производства в составе паспорта сосуда, работающего под давлением, инструкции по эксплуатации, протоколов FAT, SAT, OQ и IQ.



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК НАСЕКОМЫХ Sf9 В MULTITRON CELL С СИСТЕМОЙ SHAKERBAG OPTION

Материал предоставлен компанией Infors

ВВЕДЕНИЕ

Клетки насекомых Sf9 представляют собой клоны клеточной линии Sf21, полученной из ткани яичек мотылька *Spodoptera frugiperda*. Роль клеток Sf9 в получении рекомбинанционного белка становится все более значимой, в особенности в сочетании с экспрессирующей бакуловирусной векторной системой (ЭБВС). ЭБВС можно использовать с целью заражения клеток бакуловирусом – абсолютно безвредным для человека вирусом, который доставляет в клетку нуклеотидную последовательность гена и заставляет клетку производить необходимый белок. Рост клеток Sf9 можно ускорить путем увеличения концентрации глюкозы, поэтому в данном случае рекомендуется применять культивирование с подпиткой.

Линия клеток Sf9 легко культивируется. Подобно клеткам млекопитающих, клетки насекомых демонстрируют более высокий уровень резистентности в отношении продуктов деструкции и более выраженную реакцию на стресс, что делает их оптимальным материалом для культивирования путем встряхивания легкими круговыми движениями в одноразовых мешках.

Приведенный пример демонстрирует процесс культивирования клеточной линии Sf9 в одноразовых мешках объемом 2 л в шейкере-инкубаторе Multitron Cell с системой ShakerBag Option (INFORS HT, CH-Bottmingen).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ АППАРАТА MULTITRON CELL

- ✓ Наличие системы ShakerBag option.
- ✓ Амплитуда встряхивания – 50 мм.
- ✓ Прямая подача воздуха.

- ✓ Охлаждение.
- ✓ Возможность использования различных подставок (для одноразовых мешков, с кюветодержателями для колб и т.д.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СПЕЦИФИКАЦИИ

Клетки насекомых Sf9 культивировали в одноразовых мешках общим объемом 2 л (рабочий объем 1 л). Посевная концентрация колебалась в пределах $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Минимальный объем подпитываемых клеточных культур в больших мешках для культивирования составлял 25% от максимального рабочего объема камеры. Условия культивирования были следующие: температура – 27 °C, водородный показатель pH – около 6. Клетки Sf9 обеспечивались воздухом посредством прямой подачи газа.

ПОДПИТЫВАЕМЫЕ КУЛЬТУРЫ

а) Питательная среда. Процесс культивирования клеток в одноразовой камере объемом 2 л был запущен по специально подобранному для данной цели плану подпитки с использованием GIBCO Sf-900 II SFM (Invitrogen), бессывороточной среды, смешанной с Pluronic F-68 и глутаминовой средой. Данная питательная среда была разработана непосредственно для культивирования клеток насекомых; она отличается высокой концентрацией глюкозы.

б) Одноразовый мешок объемом 2 л. Перенос посевной культуры в одноразовый мешок объемом 2 л осуществлялся при концентрации клеток 1×10^6 на 1 мл с жизнеспособностью > 75% в 300 мл питательной среды SF-900 II SFM. Процесс культивирования занял в целом 10 дней. В первый день была произведена подпитка клеток 200 мл питательной смеси, в результате чего итоговый объем среды возрос до 500 мл. Далее, на второй и пятый дни эксперимента, в мешок добав-

ляли еще по 200 мл смеси, а на шестой день и далее объем подпитки сократили до 100 мл. В результате добавления питательной среды рабочий объем среды Sf-900 II SFM достиг 1 л.

Для обеспечения клеток кислородом в одноразовый мешок постоянно подавался воздух (1 об/мин). Клетки насекомых встряхивались на скорости 35 об/мин.

АНАЛИЗ

а) Анализ параметров. Ежедневное определение концентрации жизнеспособных клеток выполнялось с использованием системы Cedex (Innovatis). Для анализа роста и выработки субстрата применялся аппарат Bioprofile Analyser 100 (Nova Biomedical).

б) Формулы. Для вычисления максимального уровня роста μ_{\max} и времени удвоения t_d использовалась нижеприведенная формула.

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{t_2 - t_1} \left[\frac{1}{h} \right], \quad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} [h].$$

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для усовершенствования процесса культивирования клетки насекомых Sf9 в течение нескольких дней выращивались в одноразовых мешках объемом 2 л в шейкере-инкубаторе Multitron Cell с системой ShakerBag Option. В процессе культивирования клеток насекомых Sf9 производился отбор и анализ ежесуточной пробы с целью максимально точного сравнения уровней концентрации клеток, потребления субстрата и формирования промежуточных продуктов обмена веществ.

До тех пор пока питательная среда не достигла максимального рабочего объема 1 л, ежедневная постепенная подпитка свежей питательной средой обеспечивала рост клеток Sf9 с максимальной концентрацией жизнеспособных клеток $1,3 \times 10^7$ клеток на 1 мл и общей жизнеспособностью >85% к седьмому дню культивирования. Потребление глюкозы наблюдалось в сравнении с ростом клеток; оно достигло лимитирующей концентрации на девятый день исследования. Процесс культивирования был завершен на десятый день после полного потребления субстрата и снижения уровня жизнеспособности клеток ниже 70% (рисунок 2).

Максимальный уровень роста клеток μ_{\max} , которого удалось достичь в ходе исследования, составил 0,6038 в сутки, а время удвоения t_d составило 27,55 ч. Максимальная концентрация клеток была зафиксирована на уровне $1,3 \times 10^7$ на 1 мл, при этом жизнеспособность клеток составила >85% (рисунок 3).



Рисунок 1. Аппарат Multitron Cell c ShakerBag Option для трех одноразовых мешков объемом 2 л

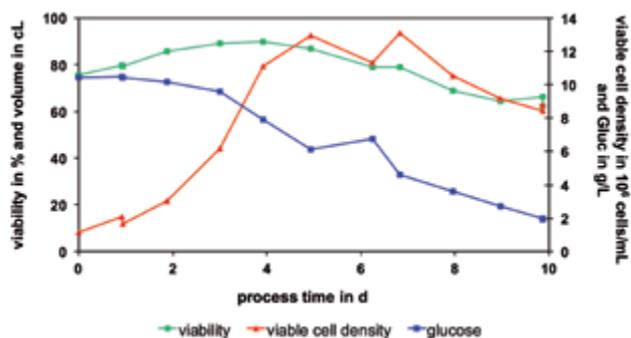


Рисунок 2. Сравнение плотности и жизнеспособности клеток, глюкозы и объем

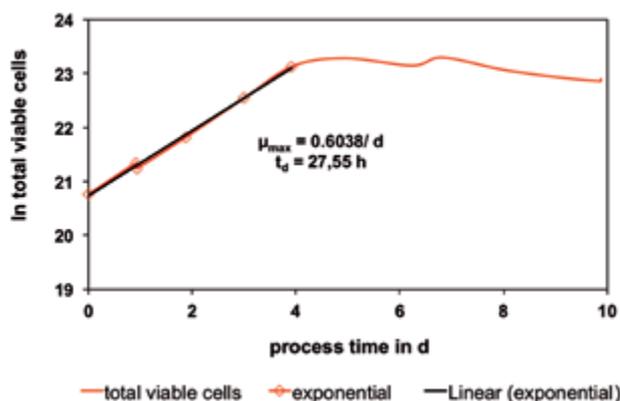


Рисунок 3. Уровень роста клеток и время удвоения

Концентрации глюкозы и глутамина отображены на рисунке 4. Оба субстрата служили в качестве источника энергии для клеток насекомых Sf9 и потреблялись в процессе их роста. Параллельно со снижением объемов глюкозы и глутамина клетки будут производить промежуточные продукты обмена веществ, аммоний и глутамин. При увеличении концентрации аммония и глутамин среда может стать опасной для клеток. При наличии аммония может начаться процесс образования глутамин; это объясняет снижение объема аммония и неизменную концентрацию глутамин (рисунок 4).

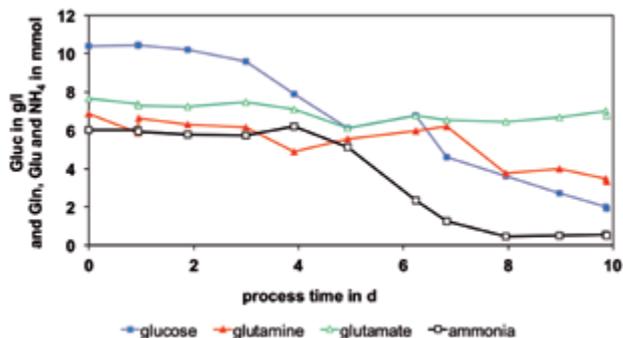


Рисунок 4. Промежуточные продукты обмена веществ при культивировании клеток Sf9

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе исследования был достигнут максимальный показатель концентрации клеток в размере $1,3 \times 10^7$ на 1 мл с жизнеспособностью $>85\%$ в одноразовом мешке объемом 2 л и рабочим объемом 1 л.
2. Оптимального уровня подачи субстрата можно достичь путем разработки специальной стратегии подпитки.
3. Амплитуда встряхивания 50 мм обеспечивает аккуратное перемешивание клеточных культур.
4. Одна секция шейкера-инкубатора Multitron Cell может быть использована для культивирования клеточных культур, рабочий объем которых составляет от 10 мл до 10 л. Таким образом, увеличение объема стартовых клеточных культур до мелкомасштабного производства возможно в одной единице оборудования.

INFORS 



ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ – УВЭЖХ 3.0

Материал предоставлен
компанией SHIMADZU

ВВЕДЕНИЕ

Независимо от области фармацевтической промышленности – будь то поиск новых лекарственных препаратов, доклинические и клинические исследования, активные ингредиенты или готовые препараты – выбор всегда останавливается на ВЭЖХ. В зависимости от стадии, например, разработка лекарственного препарата или производство готовых фармацевтических препаратов, к свойствам системы ВЭЖХ предъявляются многочисленные требования.

В настоящее время невозможно представить проведение скрининга на наличие активных веществ, а также химическую оптимизацию без применения ЖХ/МС. На данном этапе для МС-детекторов устанавливаются различные потребности и приоритеты, однако требования для всех хроматографов ВЭЖХ более или менее одинаковы.

Предполагается, что системы позволяют проводить анализ с высоким разрешением и скоростью при полном отсутствии перекрестного загрязнения. Кроме того, в системах должна быть предусмотрена возможность работы с разными видами пластин и ампул, а также с большим количеством проб. Данные системы должны работать слаженно с минимальными отклонениями при переходе от системы к системе, чтобы низкая точность впоследствии не препятствовала объединению данных. Поскольку количество проб часто ограничено, наблюдается большой спрос на системы, работающие с минимальными количествами пробы, но обеспечивающие при этом высокую чувствительность измерений.



Рисунок 1. Система Nexera с механизмом смены штативов II для большой вместимости проб

На более позднем этапе процессы идентификации, количественное определение примесей, определения стабильности/однородности содержимого, изучения растворения, а также валидация очистки требует наличия разнообразных дополнительных опций. При использовании метода ВЭЖХ при валидации очистки необходимо обеспечить высокую чувствительность и универсальную детекцию с использованием большого количества проб с низкими концентрациями, тогда как определение методом ВЭЖХ при тестировании растворения требует детекции с особенно высокой точностью больших и малых количеств в течение ограниченного периода времени. Как правило, в целях контроля качества необходимо предусмотреть прецизионные и устойчивые системы ВЭЖХ. Высокая чувствительность важна для испытаний на стабильность и на выявление примесей, поскольку продукты распада обычно появляются в значительно меньших концентрациях. Высокая точность системы обеспечивает возможность распознавания возникновения ошибки на раннем этапе и её устранения до получения результатов, выходящих за установленные пределы. Данная характеристика обеспечивает преимущество системы над ВЭЖХ системами средней точности.

При разработке УВЭЖХ системы Nexera компания «Шимадзу» уделила особое внимание не только высокой производительности, но и высокой разрешающей способности, обеспечивающей работу с современными колонками с размерами частиц менее 2 мкм и с давлением в системе более 1 000 бар, что является пределом для большинства современных систем УВЭЖХ.

Целью компании «Шимадзу» также являлось создание разносторонней системы практически с нулевым перекрестным загрязнением, которую можно было бы применять в любой области благодаря комплексным диапазонам давления потока и масштабируемого вводимого объема. Система Nexera производства компании «Шимадзу» — это гибкая комплексная система ВЭЖХ, точность и надежность которой подходит для повседневного стандартного

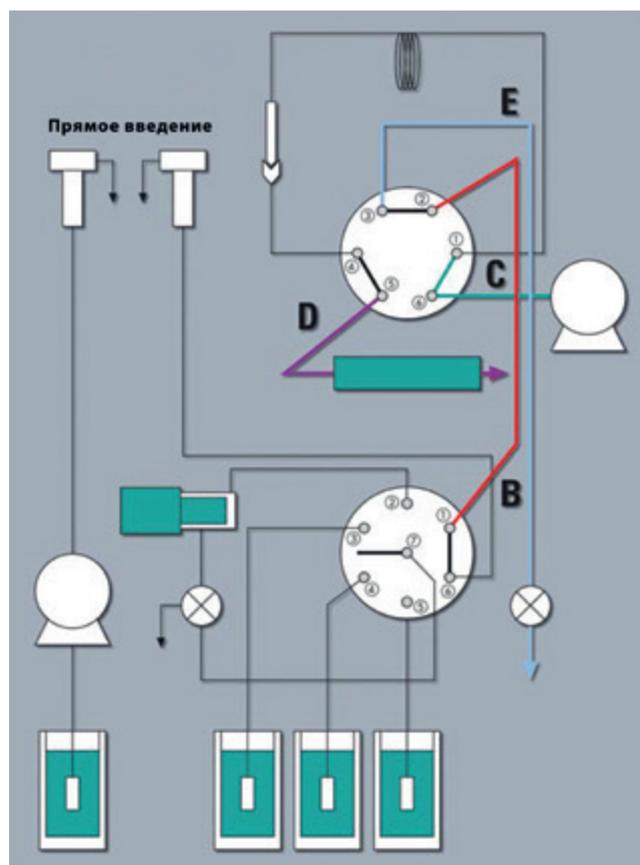


Рисунок 2. Поточная линия SIL-30AC DIIMS. Приемная линия проб является частью поточной линии, а насос-дозатор отделен посредством клапана низкого давления

анализа, а также для разделения, требующего значительной скорости и высокого разрешения. Управление системой Nexera обеспечивается программным обеспечением LabSolutions, а также такими программными платформами, как Waters Empower™, Dionex Chromeleon™ и AB Sciex Analyst™. Nexera представляет собой модульную и гибкую систему для УВЭЖХ, состоящую из:

- ✓ Высокоточных насосов для подачи растворителя LC-30AD.

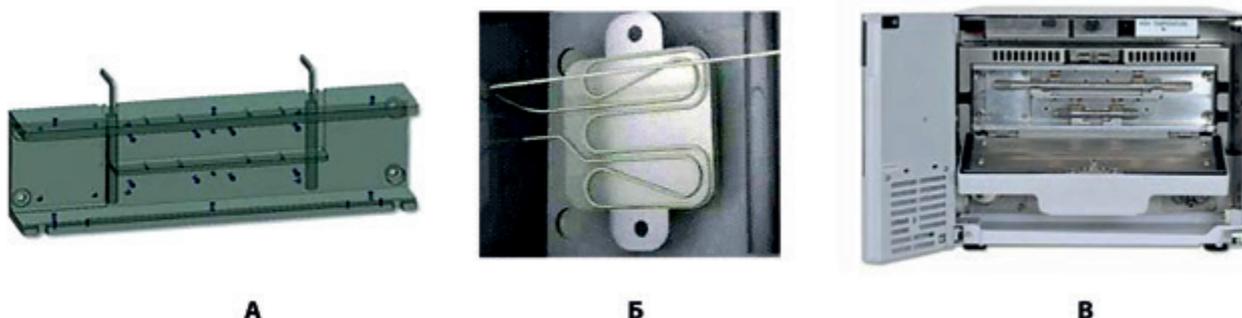


Рисунок 3. СТО-30А: вид изнутри.

А – Нагревательный блок и разделенные плавкие предохранительные вставки; Б – устройство предварительного нагрева малого объема/ малого рассеяния; В – отделение для колонок

- ✓ Быстродействующего и гибкого автоматического автодозатора SIL-30AC с самым низким перекрестным загрязнением, представленном на рынке.
- ✓ Механизма смены штативов Rackchanger II для сверхбольших количеств проб.
- ✓ Термостата для стандартных колонок, снабженного ручным переключающим клапаном колонок, смесительных реакторов и больших колонок, а также нового специализированного высокотемпературного колоночного термостата, позволяющего нагревать колонку до 150 °С.

При применении полумикропроточных кювет с низким рассеиванием и частотой отбора проб 100 Гц ВЭЖХ детекторы компании «Шимадзу» подходят для высокоскоростного разделения с высоким разрешением. Далее представлено подробное описание основных модулей системы Nexera.

Модуль подачи растворителя LC-30AD представляет собой двухпоршневой насос с высоким разрешением, рассчитанный на малые объемы. Данный насос вводит новое представление о прецизионности и точности современных насосов для подачи растворителя. Скорости потока в нем варьируются в диапазоне от 0,0001 мл/мин до 10 мл/мин, а диапазон давления составляет до 130 мПа. LC-30AD позволяет создавать двойные или тройные градиентные системы с высоким давлением, а также четырехкомпонентные градиентные системы с низким давлением.

Многоуровневые реакторы для смешивания растворителей (патент компании «Шимадзу») двух типов позволяют смешивать растворители в системах с минимизированным удерживаемым объемом. В зависимости от установленных требований доступны реакторы объемом 180 мкл или 20 мкл.

Что касается параметров перекрестного загрязнения и воспроизводимости, то по техническим характеристикам автодозатор SIL-30AC превосходит любой

другой пробоотборник ВЭЖХ, существующий сегодня на рынке. Для проб и матриц, имеющих критическое значение, перекрестное загрязнение может быть исключено применением трех промывочных растворителей (плюс один растворитель для промывки наружной иглы) в сочетании с разными режимами промывки до и после всасывания проб.

Помимо хорошо отлаженной и точной технологии DIIMS (прямое введение с изолированной системой измерения) в автодозаторе также предусмотрен ввод через фиксированный контур для сверхбыстрого разделения при минимизированной ширине пика и задержке градиента. Функция перекрестного дозирования введения является стандартной функцией для Nexera и позволяет максимально сократить время цикла.

Для высокотемпературного LC анализа при нагреве до 150 °С система Nexera обеспечивает возможность эффективного предварительного нагрева растворителей, что позволяет создать стабильные и надежные условия. Усовершенствованный интеллектуальный стабилизатор нагрева (ИНВ) минимизирует размывание зоны во время высокотемпературного анализа благодаря применению независимо контролируемых зон нагрева в отделении для колонки, что позволяет достичь точной температуры в колонке независимо от скорости потока. Наличие послекolonочного охладителя позволяет понизить шум детектора при работе с высокими температурами.

Почему следует выбирать систему, превосходящую требования?

Следующий пример показывает серию циклов, направленных на определение содержания активного ингредиента. Спецификация требований пользователя в отношении прецизионной точности площади пиков (вводимый объем = 5 мкл) составляет ≤2% RSD (относительное стандартное отклонение). Наложение хроматограмм (рисунок 4) демонстрирует хо-

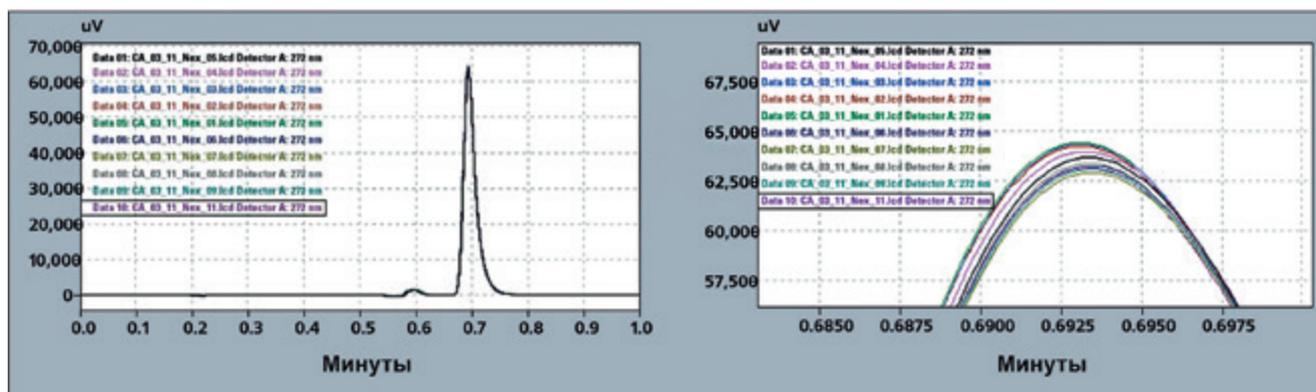


Рисунок 4. Наложение хроматограмм, полученных при 10 последовательных циклах (справа – пики в увеличенном масштабе)

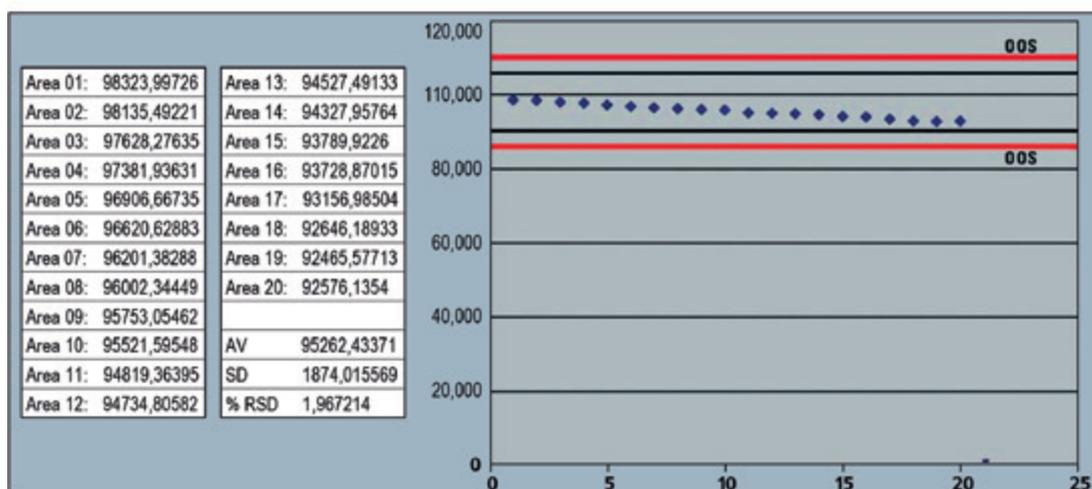


Рисунок 5. График дрейфа площадей пиков; Area – площадь, AV – среднее значение, SD – стандартное отклонение, RSD - относительное стандартное отклонение

рошую степень прецизионной точности, однако при увеличении масштаба становится явной тенденция к уменьшению площади пиков. % RSD для точности площади пиков попадает в пределы 2% RSD, но указанная тенденция (рисунок 5) указывает на существование проблемы. Следовательно, чтобы не допустить получения неудовлетворительных результатов можно устранить данную тенденцию.

Перекрестное загрязнение снижает производительность

Перекрестное загрязнение пробы может приводить к задержкам и к увеличению издержек, особенно при поиске новых лекарственных препаратов, поскольку ложноположительные кандидаты проходят весь процесс.

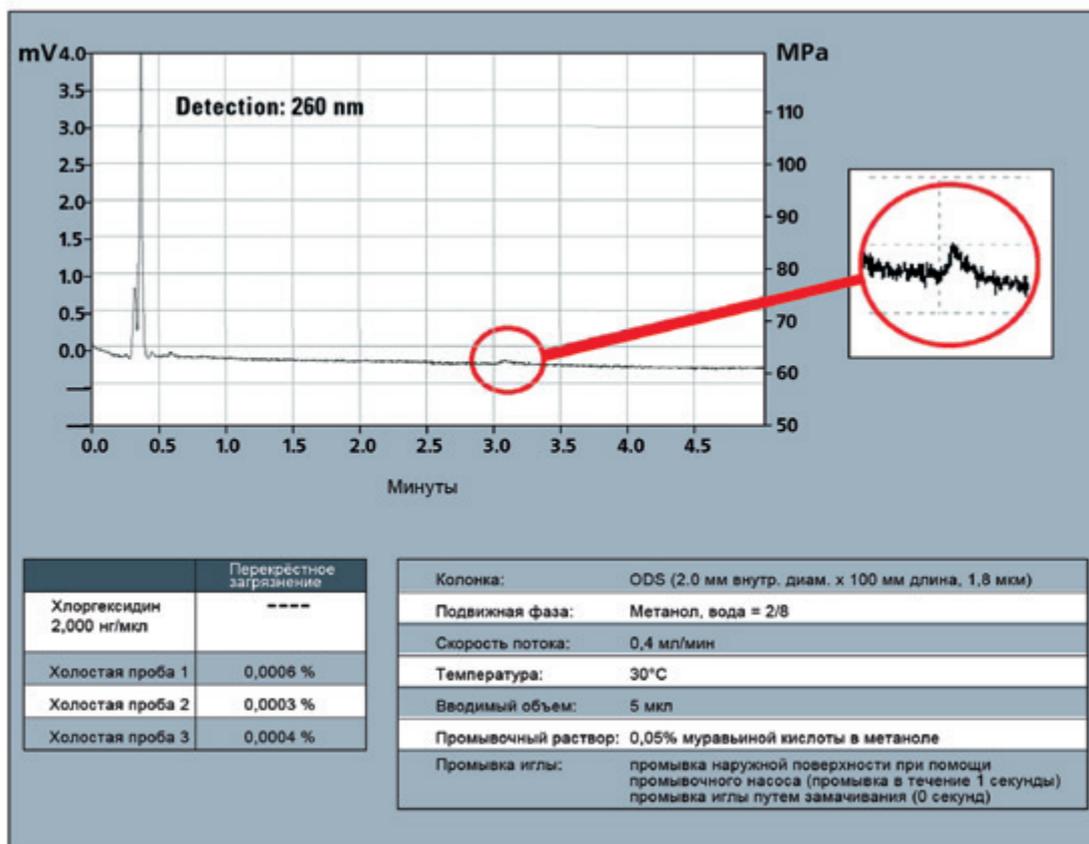


Рисунок 6. Перекрестное загрязнение хлоргексидина без промывки инжектора и внутренней части иглы

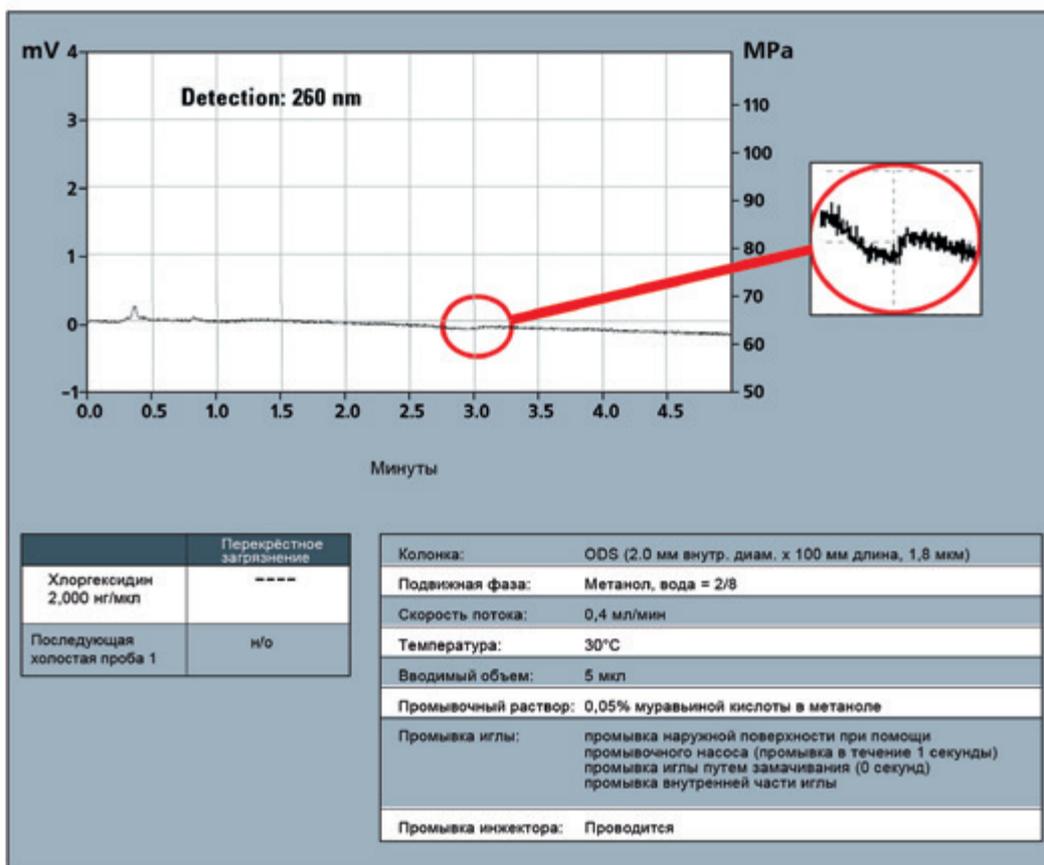


Рисунок 7. Перекрестное загрязнение хлоргексидина при промывке инжектора, внутренней части иглы и наружной поверхности

При создании DIIMS (прямое введение с изолированной системой измерения) и при условии тщательного отбора материалов автодозатором SIL-30AC перекрестное загрязнение сводится к минимуму. Применяя специальные режимы промывки, перекрестное загрязнение проб можно свести к неопределяемым количествам. На рисунке ниже показано перекрестное загрязнение 0,0006% при вводе хлоргексидина.

Применяя дополнительные этапы промывки, перекрестное загрязнение можно исключить полностью, как показано на рисунке 7.

В статье приведено только несколько примеров, демонстрирующих преимущества передовой системы для УВЭЖХ. Технические возможности и универсальность системы Nexera позволяют удовлетворить все предполагаемые потребности современной ВЭЖХ, применяемой в фармацевтической промышленности. В конечном счете, надежность системы и большие интервалы между циклами технического обслуживания определяют ее реальную ценность для повседневного применения.

Данные факторы учитывались при разработке системы Nexera. Результатом стала надежная, устойчивая и прецизионная система ВЭЖХ, которая сохранит свою актуальность и в будущем.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА УЛЬТРАЧИСТОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Две модели анализаторов общего органического углерода (ТОС) с различными методами окисления

Ультрачистая вода является одним из наиболее широко применяемых реагентов в фармацевтической промышленности, и поэтому ее качество предельно важно для технологических процессов. В течение многих лет контроль качества воды проводился посредством измерения проводимости, что позволяет оценить общую концентрацию неорганических веществ, присутствующих в воде. Данный метод детекции не учитывает органические загрязнения, поскольку они обычно не вносят вклад в проводимость. Однако органические загрязнения могут весьма существенно влиять на технологические процессы, и все актуальнее становится внесение количественного определения всех видов органических веществ в процедуры контроля качества для проб воды.

Величина ТОС (Total Organic Carbon, общий органический углерод) может применяться в качестве суммарного показателя наличия органических со-



TOC-L c ASI-L

единений. Аналогично сигналам проводимости, которые определяются ионными соединениями, значение ТОС является мерой вклада органических соединений, присутствующих в пробе воды.

В зависимости от области применения требуется вода разной степени чистоты. В Европейской Фармакопее определены несколько степеней качества, включая такие понятия как «Очищенная вода», «Сверхочищенная вода» и «Вода для инъекций».

Разъяснение терминологии

Вода для инъекций – это ультрачистая вода, применяемая при приготовлении растворов для инъекций. Ультрачистую воду получают посредством дистилляции. Значение ТОС для нее не может превышать 0,5 мг/л (вода для инъекций в объеме).

Сверхочищенная вода – это стерильная вода для производства лекарственных препаратов, для которых не требуется «вода для инъекций». Ее также часто применяют для промывки во время очистки. Сверхочищенную воду получают методом обратного осмоса. Значение ТОС для нее не может превышать 0,5 мг/л. Однако в Фармакопее США данная классификация не применяется. Очищенная вода применяется для производства лекарственных препаратов, не подпадающих под отдельные стандарты. Содержание органических веществ для очищенной воды определяется по значению ТОС (0,5 мг/л) или в перманганатной пробе.

Определение ТОС в соответствии с Евр. Фарм. 2.2.44

Рекомендации Евр. Фарм. 2.2.44 не предписывают использовать какой-то конкретный метод окисления при определении ТОС, однако должны выявляться различия между органическим и неорганическим углеродом. Этого можно достичь путем удаления не-

органического углерода (метод НРОС), или путем раздельного определения (дифференциальный метод). Предел обнаружения для ТОС должен составлять по меньшей мере 0,05 мг углерода/л. Применимость данного метода должна определяться в ходе испытаний на пригодность системы.

Для проведения испытаний на пригодность системы готовится стандартный раствор, содержащий сахарозу с содержанием углерода 0,5 мг/л, а также контрольный раствор 1,4-бензохинона с таким же содержанием углерода. В используемом эталонном растворе, состоящем только из воды (ультрачистой воды), уровень ТОС не может превышать 0,1 мг/л. Для проведения испытаний на пригодность системы анализируются все растворы, включая эталонный, а полученные результаты сохраняются.

ВОДЫ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ

Эталонный раствор воды: r_w

Стандартный раствор (сахароза): r_s

Контрольный раствор (бензохинон): r_{ss}

Сигнал эталонного раствора воды вычитается из сигнала отклика обоих стандартных растворов. Затем выход стандарта бензохинона вычисляется последовательно относительно стандарта сахарозы.

Выход в %:

$$\frac{r_{ss} - r_w}{r_s - r_w} \cdot 100.$$

Приемлемыми являются результаты от 85 до 115%. Проба ультрачистой воды отвечает требованиям рекомендаций, когда ее сигнал отклика (r_u) не превышает $r_s - r_w$

Определение ТОС в ультрачистой воде

Для анализа ТОС в повседневной практике применяются два метода окисления:

1. Каталитическое окисление, при котором соединения углерода превращаются в CO_2 с помощью катализатора и высокой температуры, и проводится последующая детекция в сочетании с бездисперсионным инфракрасным детектором.
2. Химическое окисление в сочетании с УФ-облучением.

Для определения показателя ТОС в ультрачистой воде можно применять оба метода. Из общих соображений нельзя ответить на вопрос, какой из двух методов представляет собой лучшее решение, так как все зависит от конкретной аналитической задачи.

Модельный ряд ТОС-анализаторов

Компания SHIMADZU предлагает две серии ТОС-анализаторов, удовлетворяющих всем требованиям по анализу качества воды и одинаково подходящих для анализа от ультрачистой воды до сильно загрязненных сточных вод (или в том числе и для валидации очистки). Приборы отличаются широким диапазоном измерений (от 0,5 мкг/л до 25000 мг/л) и могут работать либо в автономном режиме, либо посредством управления через ПК.

Однако, две серии ТОС-анализаторов различаются между собой по своей методологии при анализе ультрачистой воды. В приборах модели ТОС-VWP/WS применяется так называемое «мокрое» окисление, а в приборах модели ТОС-L применяется метод низкотемпературного окисления при 680 °С.

ТОС-L: метод каталитического окисления

В приборе ТОС-L применяется общепризнанный метод низкотемпературного термокatalитического окисления. Интегрированный модуль для подготовки образца (ISP) (комбинация 8-портового клапана и дозатора с функцией продувки) значительно сокращает время анализа и его сложность, поскольку процессы разбавления, окисления и ввода пробы полностью автоматизированы. Автоматическое разбавление позволяет увеличить диапазон измерения до 25 000 промилле (предел обнаружения: 4 мкг/л).

Кроме того, технология каталитического окисления в сочетании с приставкой TNM-1 позволяет одновременно определять ТОС/TN_b (общий связанный азот) и для этого достаточно одного введения пробы. Процедура проводится в соответствии с рекомендациями EN в отношении определения TN_b посредством хемилюминесцентного детектирования. В данном случае каталитическое окисление протекает при 720 °С. Одновременное определение ТОС/TN_b прекрасно подходит для валидации очистки, поскольку позволяет проводить дифференциальное определение между чистящим средством и препаратом.

ТОС-V_{WP}: «мокрое» окисление

Ключевым методом ТОС-V_{WP} анализатора является мощное окисление комбинацией персульфата натрия в сочетании с УФ-облучением при 80 °С. Так как для определения требуется раствор персульфата, важно, чтобы раствор не содержал никаких примесей, отрицательно сказывающихся на измеряемой величине. ТОС-V_{WP} анализатор включает автоматическую функцию, позволяющую исключить возможные загрязнения из раствора персульфата, для гарантии того, что среднее значение ТОС имеет истинное происхождение из пробы, а не из используемого раствора реагента.

Сочетание большого объема дозирования (до 20,4 мл) и с высокочувствительного NDIR детектора приводит к крайне низкому пределу обнаружения (0,5 мкг/л) и превосходной воспроизводимости в нижнем ppb диапазоне. Следовательно, ТОС-V_{WP/WS} хорошо подходит для определения ТОС в диапазоне ультраследовых количеств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приборы обоих типов с различными способами окисления могут применяться для определения ТОС согласно рекомендациям EP 2.2.44. Преимуществом низкотемпературного метода каталитического окисления является высокая степень окисления проб, в частности содержащих твердые частицы. Кроме того, при помощи данного метода можно проводить одновременные измерения ТОС/TN_b.

Преимуществом химического окисления является возможность ввода большого объема пробы, что приводит к более высокой чувствительности и, следовательно, позволяет проводить измерения с высокой прецизионностью в нижнем ppb диапазоне.



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 образцов 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.

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

<p><i>Наиболее интересные для Вас разделы:</i></p> <p><input type="checkbox"/> Новые методики анализа</p> <p><input type="checkbox"/> Регистрационные вопросы</p>	<p><i>Какие материалы вы хотели бы видеть в следующих номерах:</i></p> <p><input type="checkbox"/> Практические пособия выполнения анализов</p> <p><input type="checkbox"/> Новости фармацевтической отрасли</p> <p><input type="checkbox"/> Пути решения трудностей при регистрации</p> <p><input type="checkbox"/> Аналитические статьи и обзоры</p> <p><input type="checkbox"/> Оборудование для разработки и анализа</p>
<p><i>Нужно ли размещать тематические рекламные блоки в журнале:</i></p> <p><input type="checkbox"/> Да</p> <p><input type="checkbox"/> Нет</p>	<p><i>Ваши предложения и пожелания:</i></p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

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!