

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



РУДН



РОССИЙСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ДРУЖБЫ
НАРОДОВ

РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ДРУЖБЫ НАРОДОВ



РУДН

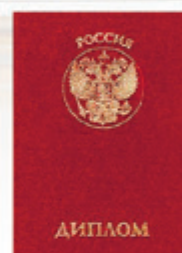
ПРИВЕТСТВУЕТ!

МАГИСТРАТУРА

33.04.01 – ПРОМЫШЛЕННАЯ ФАРМАЦИЯ

Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством

По окончании обучения выпускники программы получают – два диплома
российского и международного образца с присвоением квалификации
магистра по направлению 33.04.01 «Промышленная фармация»



117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10, корп. 2

www.nano.rudn.ru

E-mail: bionano@rudn.ru

Тел.: +7 (499) 936-86-25

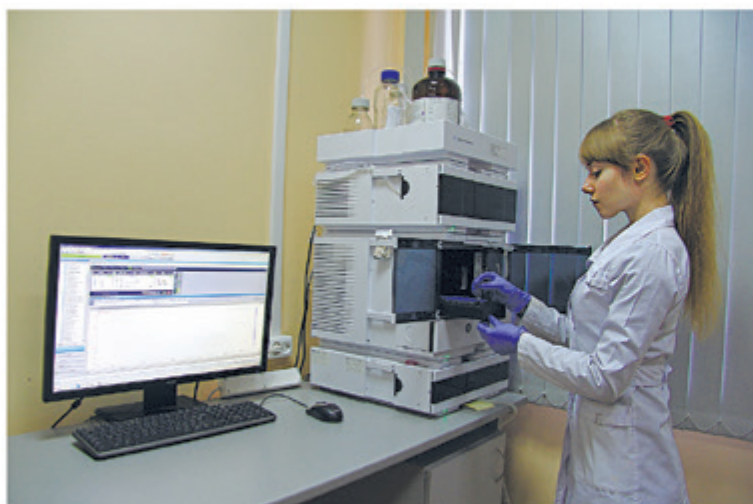
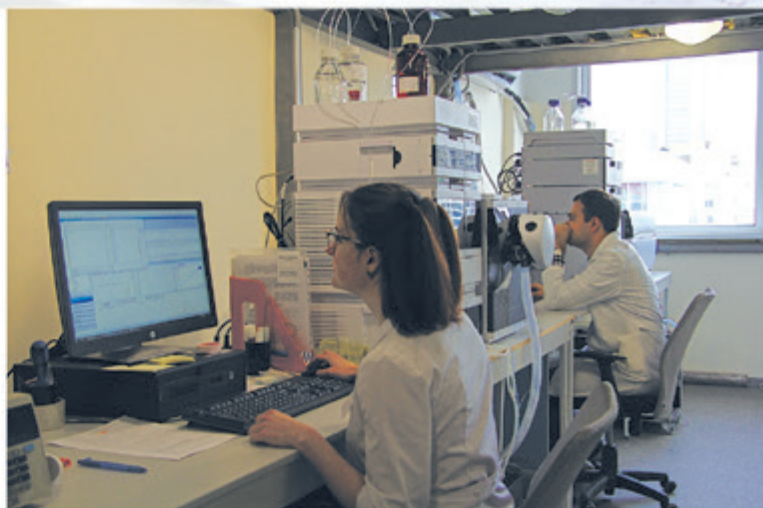
+7 (499) 936-85-99



ООО «Центр фармацевтической аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих государственных программ развития фармацевтической промышленности (Фарма-2020)

Основными видами деятельности центра являются:

- биоаналитические исследования (аналитический этап исследований биоэквивалентности, доклинических исследований и 1 фазы клинических исследований) хими-ко-фармацевтических лекарственных средств, нано-препаратов и препаратов-биоаналогов;
- сравнительный тест кинетики растворения (моделирование высвобождения лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте в условиях *in vitro*);
- статистическая обработка результатов биоаналитических исследований и описание фармакокинетики препаратов;
- разработка, валидация и апробация методик анализа лекарственных средств



Область сертификации:

- научно-исследовательская работа;
- проведение биоаналитических исследований;
- проведение фармакокинетических исследований;
- проведение СТРК (сравнительного теста кинетики растворения)



ООО «ЦФА»
117246, город Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел.: +7 (499) 281-81-11
www.cpha.ru E-mail: info@cpha.ru

Система менеджмента ООО «ЦФА» сертифицирована по требованиям стандартов: GLP (ГОСТ 33044-2014) в системе Сертификации Русского Регистра, свидетельство Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт), № Сертификата 16.1112.026 от 13 апреля 2018 г. Сертификат действителен до 3 августа 2019 г.; ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитация), № Сертификата 18.1497.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г.; международного стандарта ISO 9001:2015 в системе Сертификации Русского Регистра, участника международного форума по аккредитации IAF, сертификат соответствия единого образца IQNet, № Сертификата 18.1498.026 от 5 сентября 2018 г. Сертификат действителен до 5 сентября 2021 г. Область сертификации: научно-исследовательская работа, проведение биоаналитических исследований, проведение фармакокинетических исследований, проведение СТРК (сравнительного теста кинетики растворения).

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

**Учредитель**

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования Первый Московский
государственный медицинский университет имени
И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Издатель

ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)

Директор журнала

Н. В. Кульджанова

Заведующий редакцией

Н. С. Михайлова

Редакционная коллегия**Главный редактор:**

И. Е. Шохин, д.фарм.н.

info@pharmjournal.ru

Ю. И. Амму, к.биол.н.
М. В. Белоусов, проф., д.фарм.м.
Боян Салия, доц., к.фарм.н.
(Сербия)
И. А. Василенко, проф., д.х.н.
В. В. Хуторянский, к.х.н., Prof.
(Великобритания)
К. С. Гузев, д.ф.н.
Д. А. Гусаров, к.х.н.
Н. Б. Демина, проф., д.фарм.н.
С. В. Емшанова, д.фарм.н.
Т. Н. Комаров, к.фарм.н.
Ю. И. Кулинич, к.фарм.н.
О. Г. Макеев, проф., д.м.н.
Е. А. Малашенко, к.фарм.н.
Ю. В. Медведев, к.фарм.н.

Е. С. Мельников, к.фарм.н.
Р. И. Мустафин, к.фарм.н.
Н.А. Оборотова, проф., д.фарм.м.
В. В. Попов, проф., д.м.н.
В. Л. Русинов, чл.-корр. РАН, д.х.н.
Ю. А. Скорик, доц., к.х.н.
А. И. Сливкин, проф., д.фарм.н.
И. Е. Смехова, проф., д.фарм.н.
Я. М. Станишевский, проф., д.х.н.
Г. В. Сукоян, д.б.н. (Грузия)
Б. Б. Сысоев, доц., д.фарм.н.
В. Н. Ташлицкий, к.х.н.
О. В. Тринеева, д.фарм.н.
В. С. Чучалин, д.фарм.н.
Н. А. Эпштейн, к.х.н.

Редакторы

Журнал был основан
в ноябре 2012 г. и выходит
периодичностью 4 раза в год

Адрес редакции

Россия, 117246, Москва,
Научный проезд, д. 20, стр. 3
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Журнал зарегистрирован в Российском
индексе научного цитирования (РИНЦ)

Свидетельство о регистрации
СМИ ЭЛ № ФС77-75437 от 01.04.2019
выдано Федеральной службой
по надзору в сфере связи,
информационных технологий и
массовых коммуникаций

Тираж 999 экземпляров

Журнал выходит один раз в квартал

Цена свободная

Founder

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University)

Siberian State Medical University

Publisher

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Journal director

N. V. Kuldjanova

Managing Editor

N. S. Mikhaylova

Editorial board**Head Editor:**

I. E. Shohin, Sc.D.

info@pharmjournal.ru

Yu. I. Ammur, PhD
M. V. Belousov, prof., Sc.D.
Bojan Calija, as. prof., PhD
(Serbia)
I. A. Vasilenko, prof., Sc.D.
V. V. Khutoryanskiy, prof.,
PhD (UK)
K. S. Guzev, Sc.D.
D. A. Gusarov, PhD
N. B. Diomina, prof., Sc.D.
S. V. Emshanova, Sc.D.
T. N. Komarov, PhD
J. I. Kulnich, PhD
O. G. Makeev, prof., Sc.D.
E. A. Malashenko, PhD
Y. V. Medvedev, PhD

E. S. Melnikov, PhD
R. I. Moustafin, PhD
Oborotova N. A., prof., Sc.D.
V. V. Popov, prof., Sc.D.
V. L. Rusinov, RAS c.-m., Sc.D.
Yu. A. Skorik, PhD
A. I. Slivkin, prof., Sc.D.
I. E. Smekhova, prof., Sc.D.
Ya. M. Stanishevskiy, prof., Sc.D.
G. V. Sukoyan, Sc.D. (Georgia)
B. B. Sysuev, as.prof., Sc.D.
V. N. Tashlitskiy, PhD
O. V. Trineeva, Sc.D.
V. S. Chuchalin, Sc.D.
N. A. Epshtein, PhD

Editors

Journal is registered in Russian index of
scientific citation

Registration certificate
EL Media № FS77-75437 dated
01.04.2019 issued by the Federal
Service for Supervision in the Sphere
of Communications, Information
Technologies and Mass Communications

Circulation: 999 copies

A peer-reviewed quarterly journal

Free Price

Magazine was founded
in November 2012 and appears
4 times per year

Editorial office address

20/3, Nauchniy proezd, Moscow,
117246, Russia
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Содержание

Contents

От редакции	4	Introduction
Мероприятия	9	Events
Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»		«Research and development of new drug products» part
<i>Л. В. Спатлова</i>	11	<i>L. V. Spatlova</i>
Синтез, акарицидная и бактериостатическая активность соединений в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофураксана		Synthesis, Acaricidal, Bacteriostatic Activity Among the Amino Derivatives 5,7-Dichloro-4,6-Dinitrobenzofuroxana
<i>О. В. Тринеева, А. Д. Халахакун</i>	16	<i>O. V. Trineeva, A. D. Khalahakun</i>
Изучение десорбции и высвобождения терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина из эритроцитарных клеточных носителей		Study of Desorption and Exemption of Terpeno-indole Alkaloids of Vinkristin and Vinblastin from Erythrocytic Cell Carriers
<i>А. С. Карпова, Ю. В. Кочкина, С. А. Кедик</i>	22	<i>A. S. Karpova, Y. V. Kochkina, S. A. Kedik</i>
Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой для профилактики гриппа и ОРВИ		The Antiviral Activity Study of Complex Drug with Aminocaproic Acid for Prevention of Influenza and ARVI
Раздел «Фармацевтическая технология»		«Pharmaceutical Technology» part
<i>С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл.)</i>	27	<i>S. I. Kosenkova, I. I. Krasnyuk, I. I. Krasnyuk (jr.)</i>
Изучение вязкости раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей		The Viscosity Study of Naftifine Hydrochloride Solution with a Combination of Polyethylene Glycols
<i>А. В. Бондарев, Е. Т. Жиликова, Н. Б. Демина, В. Ю. Новиков</i>	33	<i>A. V. Bondarev, E. T. Zhilyakova, N. B. Demina, V. Y. Novikov</i>
Исследование морфологии сорбционных веществ		Study of Morphology of Sorption Substances
<i>А. В. Беляцкая, И. М. Кашликова, А. О. Елагина, И. И. Краснюк (мл.), И. И. Краснюк, О. И. Степанова</i>	38	<i>A. V. Belitskaya, I. M. Kashlikova, A. O. Elagina, I. I. Krasnyuk (jr.), I. I. Krasnyuk, O. I. Stepanova</i>
Нитрофураны для наружного применения (обзор)		Nitrofurans for External Use (Review)
<i>Ю. Н. Барсукова, О. А. Мельникова</i>	48	<i>Yu. N. Barsukova, O. A. Melnikova</i>
Мягкая лекарственная форма с наночастицами для остановки кровотечения: обоснование состава и технология получения		Soft Medical Form with Nanoparticles to Stop Bleeding: Substantiation of Composition and Technology of Obtaining
<i>Н. А. Ляпунов, И. А. Зинченко, Е. П. Безуглая, А. А. Лысокобылка</i>	55	<i>N. A. Lyapunov, I. A. Zinchenko, E. P. Bezuglaya, A. A. Lysokobilka</i>
Влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей		Effect of the Ketoprofen Distribution in Cream-gels on the Formation of the Impurities
<i>Т. А. Тимофеева, М. В. Дмитриева, Л. Л. Николаева, О. Л. Орлова, Н. А. Оборотова, А. П. Полозкова, И. И. Краснюк</i>	66	<i>T. A. Timofeeva, M. V. Dmitrieva, L. L. Nikolaeva, O. L. Orlova, N. A. Oborotova, A. P. Polozkova, I. I. Krasnyuk</i>
Оценка влияния технологических факторов на стабильность липосом фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда		Assessing the Impact of Technological Factors on the Stability of Liposomes the Photosensitizer Phthalocyanine Series
<i>Н. В. Мазова, А. Л. Марченко, И. Е. Смехова</i>	74	<i>N. V. Mazova, A. L. Marchenko, I. E. Smehova</i>
Разработка состава и технологии получения гранул омепразола в аппарате псевдооживленного слоя		Research and Development of the Composition and Technology Receiving of Granules of Omeprazol in the Fluid Bed Apparatus
Раздел «Методы анализа лекарственных средств»		«Analytical Methods» part
<i>Г. Р. Кутателадзе, Л. М. Федосеева</i>	80	<i>G. R. Kutateladze, L. M. Fedoseeva</i>
Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края		Research in the Development and Validation of the Method of Quantitative Determination of Flavonoids in the Common Sorrel Herba, Gathered in the Altai Territory
<i>Б. В. Бровченко, В. А. Ермакова, Д. О. Боков, И. А. Самылина, Н. Б. Лазарева</i>	87	<i>B. V. Brovchenko, V. A. Ermakova, D. O. Bokov, I. A. Samylnina, N. B. Lazareva</i>
Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ		Evaluation of Glycyrrhizic Acid Content in Licorice Roots and Products of its Processing by HPLC-UV Method

М. П. Макарова, А. В. Сыроешкин, Т. В. Максимова, И. С. Матвеева, Т. В. Плетенёва	93	M. P. Makarova, A. V. Syroeshkin, T. V. Maksimova, I. S. Matveeva, T. V. Pleteneva
Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофицинальных растениях		Features of Microelements Express-determination in Medicinal and Nonoficinal Plants by X-Ray-Fluorescence Analysis
А. А. Скибина, Д. О. Боков, И. В. Гравель, В. А. Ермакова, И. А. Самылина	98	A. A. Skibina, D. O. Bokov, I. V. Gravel, V. A. Ermakova, I. A. Samylina
ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе		HPLC-Analysis of Phenolic Complex in Pectoral Species № 4 and it's Dry Extract
Н. О. Ким, Е. А. Ивановская	103	N. O. Kim, E. A. Ivanovskaja
Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии		Determination of Mercury Impurities in Protamine Sulfate Medicament by Stripping Voltammetry
Раздел «Доклинические и клинические исследования»		«Preclinical and clinical study» part
Д. С. Богданова, Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, Е. С. Мельников, О. А. Мискив, Ю. В. Медведев	108	D. S. Bogdanova, T. N. Komarov, I. E. Shohin, E. S. Melnikov, O. A. Miskiv, Yu. V. Medvedev
Разработка и валидация методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека		Development and Validation of Tadalafil Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method
И. И. Мирошниченко, Ю. Е. Шилов	115	I. I. Miroshnichenko, Y. E. Shilov
Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике		Analysis of Biological Samples in a Contemporary Laboratory Practice
Раздел «Регуляторные вопросы»		«Regulatory Issues» part
Н. А. Эпштейн	122	N. A. Epshtein
Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике		Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice
Рецензия на монографию	131	Monograph review

Кадровый резерв для фармацевтической отрасли Магистратура «Промышленная фармация»



Я. М. Станишевский, д.х.н., профессор – директор института биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов (РУДН); руководитель образовательной программы «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» направление 33.04.01 «Промышленная фармация».
<http://nano.rudn.ru>

Рассказывает директор института биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов (РУДН), д.х.н., профессор Я. М. Станишевский

Ярослав Михайлович, какова сейчас на Ваш взгляд ситуация с подготовкой кадров для фармацевтической отрасли в России?

Одной из приоритетных задач стратегического развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года является обеспечение отрасли квалифицированными кадрами. Дефицит высококвалифицированных кадров и острая нехватка специалистов такова на

сегодняшний день тенденция современного фармацевтического рынка. Причин и способов решения этой проблемы высказывается немало. Однако то, что в одночасье эта проблема не решается и дефицит качественных кадров, а следовательно, борьба за таланты будут всегда, согласны все игроки фармацевтического рынка.

Сегодня перечень направлений подготовки высшего профессионального образования, никак не коррелирует с запросами фармацевтического рынка?

В настоящее время это является одной из причин неудовлетворительной ситуации с обеспечением кадрами фармацевтической отрасли.

Однако, в 2017 году профессиональным сообществом был разработан новый федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования (ФГОС ВО) представляющий собой совокупность обязательных требований при реализации основных профессиональных образовательных программ высшего образования – программ магистратуры по направлению подготовки 33.04.01 Промышленная фармация (утвержден приказом Минобрнауки от 26 июля 2017 г. № 705).

Это позволило ряду ведущих университетов страны, опираясь на ФГОС ВО по направлению подготовки 33.04.01 Промышленная фармация,



открыть у себя магистерские образовательные программы и готовить специалистов технологов и исследователей для фармацевтической промышленности, а не только фармацевтов по продажам препаратов в аптеке.

Расскажите, пожалуйста, об образовательной программе магистратуры открытой в Российском университете дружбы народов (РУДН) по направлению подготовки 33.04.01 Промышленная фармация?

Развитие современной российской фармацевтической отрасли требует качественной подготовки высококвалифицированных специалистов обладающих профессиональными знаниями, умениями и навыками в области биофармацевтических технологий, а также компетенциями в организационно управленческой деятельности фармацевтических предприятий.

В 2019 году в институте биохимической технологии и нанотехнологии РУДН была открыта новая магистерская программа «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» в рамках направления 33.04.01 «Промышленная фармация». Данная образовательная программа магистратуры разработана в соответствии с требованиями ФГОС ВО 33.04.01 Промышленная фармация.

Целью программы является подготовка специалистов в области фармацевтической биотехнологии, организацией фармацевтического производства, контролем качества и оборотом лекарственных средств.

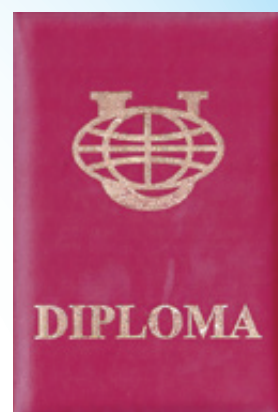
Какие преимущества данной образовательной программы?

К преимуществам магистерской образовательной программы «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» можно отнести то, что по окончании обучения вы приобретете знания, умения и навыки в области биофармацевтических технологий, знакомитесь с основными методами контроля качества лекарственных средств, а также приобретете знания и навыки по организации и управлению фармацевтическим производством. На протяжении всего обучения опытные преподаватели – эксперты в ранге докторов и кандидатов наук будут вашими наставниками. Также, хотелось бы отметить, что во время обучения у студентов есть возможность принимать активное участие в научно-исследовательской деятельности института, выступать с научными докладами на конференциях, выставках, семинарах, научных школах, и участвовать в стипендиальных конкурсах, проектах и грантах. Учебный процесс достаточно гибкий и построен таким образом, что имеется возможность совмещать обучение и профессиональную деятельность.

По окончании обучения выпускники программы получают – два диплома российского и международного образца с присвоением квалификации магистр по направлению 33.04.01 «Промышленная фармация».



Диплом российского образца



Диплом международного образца

Выделите основные принципы организации учебного процесса по данной образовательной программе?

Основными принципами организации учебного процесса по магистерской программе «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» являются: построение учебного процесса с учетом современных требований биомедицинской и фармацевтической промышленности; максимальное приближение учебного процесса к условиям современных биомедицинских и фармацевтических технологий за счет расширения практических и лабораторных занятий на базовых предприятиях; привлечение ведущих экспертов, ученых и специалистов-практиков для проведения лекций, мастер-классов, семинаров, летних школ, конференций на русском и английском языках; конкурентоспособность дисциплин образовательной программы.

Как построен учебный процесс, и какие дисциплины планируются изучать по данной программе?

Учебный процесс построен традиционно для классических университетов с разбивкой по семестрам или модулям (четвертям). В учебный план входят базовые дисциплины, вариативные дисциплины и дисциплины по выбору. Дисциплины по выбору входят в четыре блока, из которых студент имеет возможность выбрать одну дисциплину из каждого блока. Также, в учебном плане предусмотрен государственный экзамен и защита магистерской диссертации.



Успешная подготовка магистерской работы (диссертации) к защите возможна благодаря высокому качеству выполняемых научно-исследовательских работ, их инновационная направленность, а также современное техническое оснащение лабораторий и центров РУДН. Это способствует фундаментализации образования и росту заинтересованности студентов и их стремлению участвовать в работах, проводимых научными коллективами в области биофармацевтических технологий и разработок лекарственных средств.

Предметное поле магистерской программы охватывает процессы разработки, исследований, экспертизы, организации производства, контроля качества, регулирования и применения лекарственных средств.

Основные дисциплины образовательной программы:

- | | |
|---|--|
| 1. Организация и управление фармацевтическим производством. | 12. Физико-химические методы анализа. |
| 2. Технология производства лекарственных средств. | 13. Физическая и коллоидная химия лекарственных средств. |
| 3. Методы контроля качества биофармацевтической продукции. | 14. Разработка и контроль качества фитопрепаратов. |
| 4. Надлежащая регуляторная практика. | 15. Промышленная микробиология. |
| 5. Принципы контроля качества лекарственных средств. | 16. Охрана объектов интеллектуальной собственности. |

- | | |
|--|---|
| 6. Разработка и регистрация лекарственных средств. | 17. Иммунобиологические препараты. |
| 7. Актуальные вопросы фармацевтической промышленности. | 18. Промышленная токсикология. |
| 8. Введение в биоинформатику. | 19. Процессы и аппараты в производстве биофармацевтической продукции. |
| 9. Основы экономики для фармацевтического предприятия. | 20. Нанотехнологии в медицине. |
| 10. Менеджмент в профессиональной деятельности. | 21. Иностранный язык в профессиональной деятельности. |
| 11. Промышленная биотехнология. | |

Во время обучения студенты имеют возможность принять участие в международных и российских научно-исследовательских проектах, конференциях научных школах и семинарах, а после окончания учёбы получить высокооплачиваемую работу.

Где могут работать выпускники данного направления подготовки 33.04.01 «Промышленная фармация»?

Областью профессиональной деятельности выпускников в первую очередь являются фармацевтические компании, а также центры и лаборатории контроля качества лекарственных средств, а во вторую предприятия химической отрасли, лаборатории научно-исследовательских институтов, R&D центры производственных компаний и др.



Кто может учиться по данной образовательной программе и как поступить в РУДН?

В магистратуру на программу «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» в рамках направления 33.04.01 «Промышленная фармация» приглашаем медиков, фармацевтов, биотехнологов, химиков, биологов, генетиков, технологов, инженеров и всех желающих, имеющих диплом бакалавра, специалиста или магистра.

В 2019 году прием документов для поступления в магистратуру будет осуществляться с 9 июня по 31 сентября 2019 года.

Срок обучения по данной программе 2 года по очной форме обучения, и 2 года 6 месяцев по заочной форме обучения без отрыва от работы.

Стоимость обучения в 2019 г. для граждан РФ и СНГ составляет по очной форме обучения – 285 тыс. руб. в год [на первый год имеется 20% скидка (228 тыс. руб.)], по заочной форме – 150 тыс. руб. в год.

Вид вступительного испытания – экзамен (вопросы к экзамену и процедура экзамена

размещены на официальном сайте <http://nano.rudn.ru>).

Во время обучения вас ждет интересная и насыщенная студенческая жизнь, бесплатное медицинское обслуживание для студентов на территории студенческого городка, отсрочка от службы в вооружённых силах РФ на время учёбы по очной форме обучения.

**Добро пожаловать в РУДН!
«Открой мир в одном университете»**

Контактная информация:

Российский университет дружбы народов (РУДН).

Институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН).

Адрес: Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая д. 10/2.

Тел.: +7 (499) 936-86-25; +7 (499) 936-85-99

e-mail: bionano@rudn.ru

<http://nano.rudn.ru>



НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Медиа-партнерство



Наше издание приглашает к сотрудничеству специалистов и экспертов фармацевтического рынка, задействованных в сфере разработки и производства лекарственных средств, а также производителей сырья, материалов и оборудования, необходимого для оснащения лабораторных комплексов и производственных объектов.

В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

➤ Публикации в печатном и электронном журнале

- Научные статьи
- Рекламные статьи
- Рекламные модули

➤ Баннерная реклама на сайте

Размещение рекламных баннеров на сайте
pharmjournal.ru

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail маркетинг (в базе 16500 адресов)

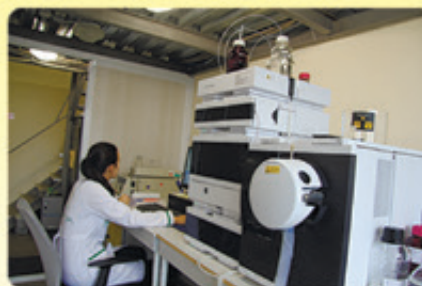
➤ Участие в качестве спикера/экспонента в конференциях, организуемых нашим изданием



О журнале

Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

- ✓ Поиск и разработка новых лекарственных средств.
- ✓ Научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования до создания стандартных и терапевтически эффективных ЛС.
- ✓ Аналитические методики контроля качества.
- ✓ Подходы к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований.
- ✓ Валидация методик, подготовка регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP-окружении.



Включен в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

Редакция ведет работу по включению журнала в список цитирования SCOPUS.

Научный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» является партнером ключевых мероприятий фармацевтической отрасли:



- ✓ Фармацевтический форум стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российский Фармацевтический Форум.
- ✓ GMP-конференция с международным участием.
- ✓ Дженоерики и биосимиляры в России и ЕАЭС.
- ✓ IPHEB Russia.
- ✓ И других не менее значимых мероприятий.

**По вопросам информационного сотрудничества
просьба обращаться по электронной почте
info@pharmjournal.ru; pharmjournalru@gmail.com
или по телефону +7 977 781 86 18**

VIII ФОРУМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ УПАКОВКИ «ФАРМАПАК»

Завершился VIII Форум фармацевтической упаковки «ФАРМАПАК», который проходил с 23 по 25 апреля 2019 года в ЦВК «Экспоцентр» (г. Москва). Организатором мероприятия выступила Ассоциация производителей фармацевтической упаковки.



Форум «ФАРМАПАК» и выставка упаковочных материалов, оборудования, технологий для фармацевтических компаний – это уникальная площадка, в рамках которой можно обсудить актуальные вопросы, познакомиться с готовыми решениями и получить консультации от экспертов фармацевтического рынка. Более 600 представителей производств по выпуску лекарственных препаратов посетили Форум и выставку в 2019 году. Партнерами мероприятия стали 28 компаний-поставщиков оборудования и услуг для фармацевтических компаний: АО «ПРОМИС», Центр развития перспективных технологий, «Михаил Курако», «Tracelink», «ACG Inspection», «OCS-WIPOTEC», «Scanware», «BOSCH», «ORIGINAL GROUP», «Регистр лекарственных средств России®» «ROLSTECH», «TRAXEED», АО «Р-Фарм», «DIVIDELLA AG», АО НПК «КАТРЕН», Аналитическая компания «АРЭНСИ Фарма», АО «Корпорация развития Московской области», «Metsa Board», «Inter Pharm Technology», «Antares Vision» и др.

Темой сессии 23 апреля стала маркировка лекарственных препаратов в России. Модератором деловой программы традиционно выступал генеральный директор АО «ПРОМИС» **Слиняков Евгений Евгеньевич**. Уже в 2020 году все лекарственные средства должны быть промаркированы, однако, по данным руководителя продуктового направления «Фарма» Центра развития перспективных технологий Антона Харитоновича на данный момент только 16 000 участников и 2 500 лекарственных препаратов заре-

гистрированы в системе. Вся нормативная база уже сформирована, идет процесс тестирования нанесения криптокода на упаковку размерами 88 и 44 символов. По словам представителя компании «ACG Inspection» **Сураба Шетти**, программное обеспечение должно быть достаточно гибким и безопасным, чтобы соответствовать требованиям к маркировке лекарств даже в долгосрочной перспективе. Докладчики отметили важность вовлечения всех подразделений фармацевтических компаний в бизнес-процессы сериализации и агрегации, а также привлечения поставщиков оборудования и программного обеспечения к любым тестам. Первый день Форума завершил круглый стол по опыту внедрения маркировки лекарственных препаратов, модератором которого выступил главный редактор издания «Фармацевтический вестник» **Герман Иноземцев**.

Второй день Форума был посвящен повышению эффективности фармацевтического производства за счет обучения, мотивации производственного персонала и оптимизации бизнес-процессов. Представители завода «Р-Фарм» **Евгения Закружная** и **Екатерина Репкина** рассказали о комплексном подходе в подготовке кадров, с помощью которого достигается создание положительного имиджа фармацевтических специальностей и развитие компетенций сотрудников. Практическим опытом использования системы для согласования и управления базой макетов «ОРИГИНАЛ-МАКЕТ. ПРО» поделилась **Юлия Ярошен-**



ко из компании «Биокад», отметив удобство функционала, четкость структуры, оперативность и прозрачность действий ответственных лиц при работе с оригинал-макетами инструкций и упаковки. Директор по продажам Metsa Board **Кристоф Бодри** обозначил, что картон является одним из ключевых элементов работы упаковочной линии на паспортных скоростях, в связи с чем поставщики упаковки должны использовать сырьевые материалы стабильного качества.

Основным направлением деловой программы итогового дня Форума стала маркировка для дистрибьюторов лекарственных препаратов. Директор по развитию АО НПК «Катрен» **Анатолий Тенцер** курировал выступления спикеров. В своем докладе об опыте внедрения системы маркировки на предприятии он отметил, что крупные дистрибьюторы будут готовы к ней в числе первых, но это не отменяет многочисленных нюансов при старте. Перспективы развития фармацевтического рынка в 2019 году представил директор по развитию «АРЭНСИ Фарма» **Николай Беспалов**, спрогнозировав, что объем фармрынка к концу года составит 1,41 млрд руб. В завершении представите-

ли аптечных и дистрибьюторских сетей смогли задать свои вопросы компании «Катрен».

На протяжении трех дней в рамках Форума проходила выставка упаковочных материалов, оборудования и технологий для фармацевтических компаний. На выставочных стендах участники демонстрировали широкий спектр маркировочного и упаковочного оборудования, решения по изготовлению первичной и вторичной упаковки, а также программные продукты для маркировки лекарственных препаратов.

Организаторы мероприятия вели прямую трансляцию первого дня Форума, которую можно получить, отправив запрос на почту marketing@promis.ru.



Справка

Форум фармацевтической упаковки «ФАРМАПАК» проводится с 2012 года и является одним из значимых событий на фармрынке, где можно встретиться с экспертами в области первичной и вторичной упаковки, обсудить вопросы эффективности фасовки лекарств и способы снижения производственных потерь, а также проблемы в области качества упаковки. Официальный партнёр – компания АО «ПРОМИС».



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-11-15
УДК 547.87

Синтез, акарицидная и бактериостатическая активность соединений в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофуоксана

Л. В. Спатлова^{1*}

1 – ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (КНИТУ), 420015, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68

*Контактное лицо: Спатлова Лидия В. E-mail: lidanet@inbox.ru

Статья получена: 10.10.2018. Статья принята к печати: 14.02.2019

Резюме

Введение. В последние годы вырос интерес к соединениям бензофу-роксанового ряда, поскольку они обладают широким спектром биологической активности, а кроме этого являются донорами оксида азота. В научной литературе много работ связано с синтезом и изучением биологической активности аминопроизводных 5-нитро-4,6-дихлорбензофуоксана, тогда как аминопроизводные 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана изучены недостаточно.

Цель. синтез новых аминопроизводных 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана и изучение их биологической активности.

Материалы и методы. Исследованы реакции конденсации 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана с различными ароматическими аминами, содержащими в своей структуре функциональные группы акцепторного характера. С целью увеличения выхода подобраны условия реакции (температура реакции, среда, количество амина). Структура синтезированных соединений подтверждена методами ИК, ЯМР спектроскопии и элементного анализа.

Результаты и обсуждение. Получены новые соединения в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофуоксана. Изучена острая токсичность, акарицидная и бактериостатическая активность в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. У полученных соединений выявлена высокая фармакологическая активность, превосходящая препараты сравнения (хлорофос и креолин).

Заключение. Большинство из синтезированных аминопроизводных 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана обладают высокой активностью против клещей и бактерий. Соединения содержащие в своей структуре радикалы хлора и метила, обладают биологической активностью при низких концентрациях, являются малотоксичными и относятся к 4 классу опасности.

Ключевые слова: бензофуоксаны, динитробензофуоксан, аминопроизводные, акарицидная активность, бактериостатическая активность, острая токсичность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Спатлова Л. В. Синтез, акарицидная и бактериостатическая активность соединений в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофуоксана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 11–15.

Synthesis, Acaricidal, Bacteriostatic Activity Among the Amino Derivatives 5,7-Dichloro-4,6-Dinitrobenzofuroxana

L. V. Spatlova^{1*}

1 – Kazan State Technological University, 68, Karl Marx str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russia

*Corresponding author: Lydia V. Spatlova. E-mail: lidanet@inbox.ru

Received: 10.10.2018. Accepted: 14.02.2019

Abstract

Introduction. In recent years, interest in the compounds of the benzofuroxane series has increased, because they have a wide range of biological activity, and in addition are donors of nitric oxide. In the scientific literature, many works are related to the synthesis and study of the biological activity of 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxane amino derivatives, whereas amino derivatives of the 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxane substrate have been poorly studied.

Aim. Is the synthesis of new amino derivatives of 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxane and the study of their biological activity.

Materials and methods. Investigated the reaction of condensation of 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxane with different aromatic amines, containing functional groups of acceptor character in their structure were selected. In order to increase the yield for each specific reaction, the reaction conditions were selected (the reaction temperature, medium, and the amount of amine). The structure of the compounds confirmed IR, NMR spectra and elemental analysis.

Results and discussion. New compounds in the 5,7-diamino-4,6-dinitrobenzofuroxane series were obtained. Acute toxicity, acaricidal and bacteriostatic activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were studied. The obtained compounds were found to have high pharmacological activity, superior to the comparison drug (Chlorophos and Creolin).

Conclusion. Most of the amino derivative synthesized 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxane have a high activity against mites and bacteria. Compounds containing in their structure chlorine and methyl radicals, have biological activity at low concentrations, are low-toxic and belong to the 4th hazard class.

Keywords: benzofuroxane, dinitrobenzofuroxan, amino derivatives, acaricidal activity, bacteriostatic activity, acute toxicity.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Spatlova L. V. Synthesis, acaricidal, bacteriostatic activity among the amino derivatives 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxana. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 11–15.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы вырос интерес к соединениям бензофуоксанового ряда, поскольку они обладают широким спектром биологической активности, а кроме этого являются донорами оксида азота. Авторами [1] проведены исследования NO-донорской активности соединений бензофуоксанового ряда: 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксан, 5,7-дихлор-6-нитробензофуоксан, 5,7-дихлор-4-нитробензофуоксан, а также 4-хлор-6,7-фуоксанобензофуоксан и 5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуоксан. Проведенные исследования показали, что наибольшую NO-донорскую активность проявляет 5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуоксан, что предположительно связано с наличием нитро- и гидроксигрупп в молекуле соединения.

В научной литературе много работ посвященных поиску новых биологически активных соединений в ряду 5-нитро-4,6-динитробензофуоксана. Аминопроизводные 5-нитро-4,6-дихлорбензофуоксана проявляют фунгицидную и антимикробную активность. В работе [2] представлены результаты взаимодействия 5-нитро-4,6-дихлорбензофуоксана с ароматическими аминами и азотосодержащими гетероциклами. Нуклеофильное замещение протекает по положению 4 бензольного кольца. Получены гибридные соединения 5-нитро-4,6-дихлорбензофуоксана с сульфаниламидами и антибиотиками, с целью получения новых биологически активных соединений с антибактериальными свойствами [3, 4]. Среди соединений бензофуоксанового ряда 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксан интересен тем, что на его основе можно получать новые соединения обладающие широким спектром биологической активности. Авторами [5] представлен ряд аминопроизводных 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана, которые обладают акарицидной и бактериостатической активностью при низкой концентрации.

Цель работы – синтез новых аминопроизводных 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана и изучение биологической активности полученных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы реакции конденсации 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана (1) с различными ароматическими аминами, содержащие в арильной части молекулы заместители R=Cl, Br, I, -дифенил, -азо-группа. Схема синтеза и структуры соединений (2-11) приведены на рисунке 1. Были выбраны ароматические амины, содержащие в своей структуре функциональные группы акцепторного характера. С целью увеличения выхода для каждой конкретной реакции подобраны условия реакции, а именно температура реакции, среда, количество амина. Для синтезированных новых соединений получены ИК, ЯМР спектры и элементный анализ, которые подтвердили структуру соединений.

Для получения соединений (2-11) использовали диметилсульфоксид (ДМСО) – «ХЧ», о-хлороанилин – «Ч», 2,5-дихлороанилин – «Ч», 3,4-дихлороанилин – «Ч», 3,5-дихлороанилин – «Ч», пара-бromoанилин – «Ч», 4-хлор-2-метиланилин – «Ч», 3-хлор-4-метиланилин – «Ч», 5-йод-2-метиланилин – «Ч», 2-аминодифенил – «Ч», пара-аминоазобензол – «Ч».

ИК спектры записаны на Фурье-спектрометре Vector 22 фирмы Bruker. Кристаллические образцы исследованы в виде эмульсии в вазелиновом масле. Спектры ЯМР ^1H зарегистрированы на приборе Bruker Avance-600 (600 МГц) в ацетоне- d_6 (соединения 2-6,9,10) и CDCl_3 (соединения 7, 8,11) внутренний стандарт – остаточные протоны растворителей (7.26 м. д. для CDCl_3 , 2.05 м. д. для ацетона- d_6). Элементный анализ выполнен на приборе Carlo-Erba EA 1108. Температуры плавления полученных соединений определены с помощью нагревательного столика типа Boetius. Исходный 4,6-динитро-5,7-дихлорбензо-фуоксан (1) синтезирован по методике [5].

5,7-бис(2-Хлорофениламино)-4,6-динитробензофуокса (2). В реакционной колбе растворяли 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана в 5 мл ДМСО и к раствору приливали раствор 0,4 г (0,04 моль) орто-хлороанилина в 5 мл ДМСО. Полученную реакционную массу при перемешивании нагревали до 60 °С и при этой температуре выдерживали 2 ч. Затем продукт реакции выделяли высаживанием в воду. Выпавший оранжевый продукт 2 отфильтровывали и промывали водой. Соединение 2 перекристаллизовывали из изопропанола. Выход соединения 2 0,18 г (60%), Тпл 137–138 °С, ИКС, ν , cm^{-1} : 3370 (NH); 1680 ($\text{C}=\text{N}-\text{O}$). Вычислено $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_6\text{Cl}_2$, %: С 45,0; Н 2,0; N 17,0; Cl 14,0. Найдено, %: С 45,5; Н 1,9; N 17,1; Cl 13,9. Спектр ЯМР ^1H , ацетон δ , м.д.: 9,5 (2H, с, NH), 7,23–7,43 (3H, м, H-Ar).

5,7-бис(2,5-Дихлорофениламино)-4,6-динитробензофуоксан (3) получен аналогично соединению 2 из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана и 0,6 г (0,04 моль) 2,5-дихлороанилина. Выход соединения 3 0,24 г (80%), Тпл 182–184 °С, ИКС, ν , cm^{-1} : 3360 (NH); 1680 ($\text{C}=\text{N}-\text{O}$). Вычислено $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_6\text{Cl}_4$, %: С 40,0; Н 1,4; N 15,5; Cl 26,0. Найдено, %: С 39,3; Н 1,3; N 15,4; Cl 25,9. Спектр ЯМР ^1H , ацетон, δ , м.д.: 9,2 (2H, с, NH), 6,93–7,03 (3H, м, H-Ar).

5,7-бис(3,4-Дихлорофениламино)-4,6-динитробензофуоксан (4) получен аналогично соединению 2 из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуоксана и 0,6 г (0,04 моль) 3,4-дихлороанилина. Выход соединения 4 0,25 г (86%), Тпл 185–186 °С, ИКС, ν , cm^{-1} : 3370 (NH); 1680 ($\text{C}=\text{N}-\text{O}$). Вычислено $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{N}_6\text{O}_6\text{Cl}_4$, %: С 40,0; Н 1,4; N 15,5; Cl 26,0. Найдено, %: С 39,0; Н 1,3; N 15,3; Cl 25,8. Спектр ЯМР ^1H , ацетон, δ , м.д.: 9,4 (2H, с, NH), 6,63–6,71 (2H, м, H-Ar).

5,7-бис(3,5-Дихлорофениламино)-4,6-динитробензофуоксан (5) получен аналогично соединению 2 из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлор-4,6-динитробензо-

фурок-сана и 0,6 г (0,04 моль) 3,5-дихлороанилина. Выход соединения **5** 0,18 г (60%), Тпл 187–188 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3370 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₁₈H₈N₆O₆Cl₄, %: С 40,0; Н 1,4; N 15,5; Cl 26,0. Найдено, %: С 39,2; Н 1,3; N 15,3; Cl 25,5. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 9,2 (2H, с, NH), 6,89–7,1 (2H, м, H-Ar).

5,7-бис(4-Бромофениламино)-4,6-динитробензофуроксан (6) получен аналогично соединению **2** из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитро-бензофуроксана и 0,6 г (0,04 моль) 4-диброманилина. Выход соединения **6** 0,21 г (70%), Тпл 176–177 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3350 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₁₈H₁₀N₆Br₂O₆, %: С 38,0; Н 1,7; N 14,8; Br 28,2. Найдено, %: С 37,8; Н 1,5; N 14,1; Br 28,1. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 9,9 (2H, с, NH), 7,13–7,23 (2H, м, H-Ar).

5,7-бис(2-Метил-4-хлорофениламино)-4,6-динитробензофуроксан (7) получен аналогично соединению **2** из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитробензо-фуроксана и 0,56 г (0,04 моль) 4-хлоро-2-метиланилина. Выход соединения **7** 0,23 г (79%), Тпл 164–165 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3400 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₂₀H₁₄N₆O₆Cl₂, %: С 47,5; Н 2,7; N 16,6; Cl 14,0. Найдено, %: С 46,4; Н 2,4; N 16,5; Cl 13,9. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 9,2 (2H, с, NH), 6,93 – 7,1 (2H, м, H-Ar), 2,9–3,1 (6H, CH₃).

5,7-бис(4-метил-3-хлорофениламино)-4,6-динитробензофуроксан (8) получен аналогично соединению **2** из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитробензо-фуроксана и 0,56 г (0,04 моль) 3-хлоро-4-метиланилина. Выход соединения **8** 0,27 г (68%), Тпл 167–168 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3400 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₂₀H₁₄N₆O₆Cl₂, %: С 47,5; Н 2,7; N 16,6; Cl 14,0. Найдено, %: С 47,1; Н 2,2; N 16,7; Cl 13,9. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 8,9 (2H, с, NH), 6,63–6,73 (2H, м, H-Ar), 2,9–3,1 (6H, с, CH₃).

5,7-бис(2-Аминодифенил)-4,6-динитробензофуроксан (9) получен аналогично соединению **2** из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана и 0,67 г (0,04 моль) 2-аминодифенила. Выход соединения **9** 0,2 г (68%), Тпл 169–170 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3500 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₃₀H₂₀N₆O₆, %: С 64,2; Н 3,5; N 15,0. Найдено, %: С 63,1; Н 3,4; N 14,9. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 9,3 (2H, с, NH), 6,63–6,73 (2H, м, H-Ar), 7,34–7,36 (5H, м, Ph).

5,7-бис(4-Азобензолфениламино)-4,6-динитробензофуроксан (10). В реакционной колбе растворяли 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана в 5 мл ДМСО и к раствору приливали раствор 0,79 г (0,04 моль) пара-аминоазобензола в 5 мл ДМСО. Реакционную массу при перемешивании нагревали до 20 °С и при этой температуре выдерживали 2 ч. Затем продукт реакции выделяли высаживанием в воду. Выпавший бордового цвета осадок отфильтровывали и промывали водой. Соединение **10** перекристаллизовывали из смеси изопропанол-ацетон 2:1. Выход соединения **10** 0,27 г (86%), Тпл 157–158 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3280 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₃₀H₂₀N₁₀O₆, %: С 58,4;

Н 3,2; N 22,7. Найдено, %: С 56,9; Н 3,1; N 22,6. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 8,7 (2H, с, NH), 6,82–6,93 (2H, м, H-Ar), 7,38–7,40 (5H, м, Ph).

5,7-бис(2-Метил-5-йодофениламино)-4,6-динитробензофуроксан (11) получен аналогично соединению **2** из 0,3 г (0,01 моль) 5,7-дихлоро-4,6-динитро-бензофуроксана и 0,9 г (0,04 моль) 5-йодо-2-метиланилина. Выход соединения **11** 0,26 г (87%), Тпл 175–176 °С, ИКС, ν , см⁻¹: 3380 (NH); 1680 (C=N-O). Вычислено C₂₀H₁₄N₆I₂O₆, %: С 34,8; Н 2; N 12,2; I 37,0. Найдено, %: С 32,7; Н 1,9; N 11,9; I 36,8. Спектр ЯМР ¹H, ацетон, δ , м.д.: 8,9 (2H, с, NH), 2,9–3,1 (6H, с, CH₃), 6,82–6,93 (3H, м, H-Ar).

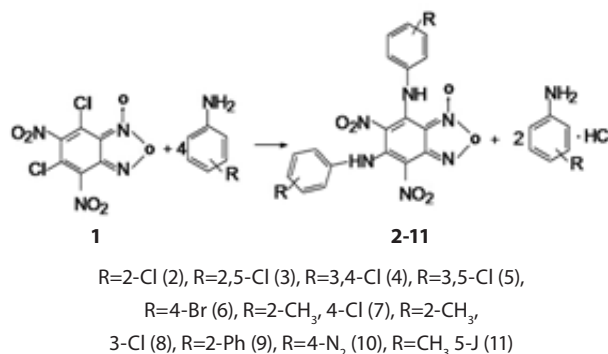


Рисунок 1. Схема синтеза соединений в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофуроксана

Оценка биологической активности осуществлялась в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств». В качестве препаратов сравнения были использованы хлорофос и креолин. [6].

Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 5100.3-96 «Общие требования к испытательным лабораториям») и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

Исследование биологической активности полученных соединений проведены в КГАВМ им. Н. Э. Баумана. Акарицидную активность препаратов изучали на крысиных клещах, предоставленных лабораторией физиологии патологической физиологии. Клещи были подготовлены по методу А. Д. Приселковой, для этого соскоб помещали в бактериологическую чашку, закрывали крышкой и помещали ее вверх дном на банку с подогретой до 50 °С водой. Через 15–25 мин из соскобов выходили клещи. Затем чашку с банки снимали, переворачивали дном вниз, причем клещи оставались на крышке. При просмотре крышки под лупой или микроскопом обнаруживали живых клещей. Затем клещей взятых от пораженных животных по 10–20 штук помещали на кусочки хлопчатобумажной ткани (диаметром 8–9 см), которую пропитывали суспензией, содержащей различные концентрации испытуемых

соединений, и оставляли в термостате на 24 ч при температуре 28–30 °С. Подсчитывали количество погибших клещей и по формуле Karber G определяя среднесмертельную концентрацию (CK_{50}) соединений:

$$Lg \text{ ImD50} = \lg D - \sigma(\Sigma Li - 0,5),$$

где D – наибольшая из испытанных доз (разведении); σ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей (при десятикратном интервале эта величина равна 1; при трехкратном – 0,477; при двукратном – 0,3; при полуторахкратном – 0,176); Li – отношение числа погибших от данной дозы животных к общему количеству животных, которым была введена эта доза; ΣLi — сумма всех значений Li для всех испытанных доз.

Бактериостатическую активность соединений изучали методом серийных разведений на штаммах *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [7]. За мини мальную бактериостатическую концентрацию (МБСК) принимали ту, при которой не происходил рост штаммов культур.

Для оценки токсичности при однократном введении в желудок определяли параметры токсичности и изучали симптомы острого отравления. Острую токсичность изучали на белых крысах весом 170–200 г. Подопытные и контрольные животные были одной линии, вида, возраста, пола, весовых характеристик. Пищевой рацион содержал все необходимые компоненты для нормальной жизнедеятельности животных. В эксперименте были использованы половозрелые белые крысы-самцы с общей массой 210 ± 4 г. Статическая группа составляла 10 подопытных и 10 контрольных животных. Доверительные границы токсичности вычисляли по методу Karber G [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований акарицидной и бактериостатической активности полученных соединений представлены в таблице 1.

Таблица 1. Акарицидная и бактериостатическая активность соединений в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофураксана

Table 1. Acaricidal and bacteriostatic activity of compounds in the series 5,7-diamino-4,6-dinitrobenzofuroxan

Соединения	Акарицидная активность, мг/кг	Бактериостатическая активность, мг/кг	
	CK_{50}	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Хлорофос	0,7	–	–
Креолин	–	0,07	0,05
2	0,004	0,01	0,12
3	0,005	0,004	0,06
4	0,01	0,004	0,001
5	0,1	0,001	0,25
6	0,04	0,25	0,03
7	0,02	0,001	0,25
8	0,1	0,25	0,12
9	0,02	0,25	0,25
10	0,2	0,25	0,12
11	0,1	0,25	0,12

Исследования акарицидной активности показали, что новые соединения превосходят препарат сравнения хлорофос. Из таблицы 1 видно, что акарицидная активность зависит от типа заместителя. Вклад, увеличивающий акарицидную активность, вносят преимущественно заместители акцепторного характера. Такие функциональные группы, как хлор, бром (соединение **2, 6**) оказывают сильное влияние на акарицидную активность. Однако введение второго атома хлора в ядро замещающего амина (соединение **4, 5**) приводит к снижению акарицидной активности. При введении в ароматическое ядро замещающего амина дополнительного метильного радикала в орто-положение относительно хлора (соединение **7, 8**) не происходит значительного увеличения акарицидной активности. Введение, в качестве дополнительного заместителя йода (соединение **11**) не изменяет активность. Замещение атома галогена в 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофураксана на пара-дифенил (соединение **9**), вызывает увеличение акарицидной активности, а азо-группа (соединение **10**) снижает ее. На биологическую активность также оказывает влияние и положение заместителя в замещающем амине. Результаты показали, что биологическая активность уменьшается от орто- через мета- к пара-изомерам. Большую биологическую активность проявляют орто-изомеры (соединение **2**).

Проведенные исследования бактериостатической активности показали, что полученные новые аминопериодические производные 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофураксана превосходят препарат сравнения креолин. Из таблицы 1 видно, что такие функциональные группы, как хлор, бром (соединение **2, 6**) оказывают сильное влияние на бактериостатическую активность. Однако введение второго атома хлора в ядро замещающего амина (соединение **3, 4, 5**) не приводит к изменениям бактериостатической активности. Введение в ароматическое ядро замещающего амина дополнительного метильного радикала (соединение **7, 8**) приводит к увеличению бактериостатической активности, если метил введен относительно хлора в орто-положение. Введение в качестве дополнительного заместителя йода, пара-дифенил, азо-группы (соединение **9, 10, 11**) не оказывает влияние на бактериостатическую активность.

Для полученных соединений была определена острая токсичность. Максимальная концентрация новых аминопериодических производных 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофураксана, использованная в эксперименте (3000 мг/кг), не вызвала гибели животных. Таким образом новые полученные соединения являются малотоксичными и относятся к 4 классу токсичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный поиск условий позволил получить новые соединения в ряду 5,7-диамино-4,6-динитробензофураксана. Большинство из синтезированных аминопериодических дихлоридинитробензофураксана

на обладают высокой активностью против клещей и бактерий. Соединения, содержащие в своей структуре радикалы хлора и метила, обладают биологической активностью при низких концентрациях. Полученные соединения являются малотоксичными и относятся к 4 классу опасности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каримова Р. Г., Гарипов Т. В. Бензофуросаны – соединения, усиливающие образование оксида азота (II) в организме животных. *Аграрный вестник Урала*. 2012; 5(97): 27–28.
2. Гибадуллина Э. М., Чугунова Е. А., Миронова Е. В., Криволапов Д. Б., Бурилов А. Р., Юсупова Л. М., Пудовик М. А. Взаимодействие 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана с ароматическими аминами и азотсодержащими гетероциклами. *Химия гетероциклических соединений*. 2012; 8: 1318–1325.
3. Чугунова Е. А., Мухаматдинова Р. Э., Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Гаврилов Н. В., Добрынин А. Б., Кудеевская Е. М., Бурилов А. Р. Новые гибридные соединения на основе бензофуросанов и сульфаниламидов. *Журнал общей химии*. 2016; 5(86): 767–771.
4. Чугунова Е. А., Мухаматдинова Р. Э., Сазыкина М. А., Сазыкин И. С., Хаммами М. И., Акылбеков Н. И., Бурилов А. Р., Кулик Н. В., Зобов В. В. Синтез и биологическая активность новых гибридных соединений на основе бензофуросанов и полиеновых антибиотиков. *Журнал общей химии*. 2016; 5(86): 772–776.
5. Патент 2255935 РФ. 5,7-дизамещенный-4,6-динитробензофуросан, обладающий акарицидной и бактерицидной активностью // Юсупова Л. М., Спатлова Л. В., Фалыхов И. Ф., Гарипов Т. В., Шиндала М., Ишкаева Д. Р. № 2003119046; заявл. 24.06.03; опубл. 2004 г. 4 с.
6. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*. 2012: 197.
7. Методы экспериментальной химиотерапии. Под ред. Г. Н. Першина. М.: *Медицина*. 1971: 526–533.
8. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. М.: *Медицина*. 1963: 262.

REFERENCES

1. Karimov R. G., Garipov T. V. Benzofuroxans - compounds that enhance the formation of nitric oxide (II) in animals. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2012; 5(97): 27–28 (In Russ.).
2. Gibadullina E. M., Chugunova E. A., Mironova E. V., Krivolapov D. B., Burilov A. R., Yusupova L. M., Pudovik M. A. Interaction 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan with aromatic amines and nitrogen-containing heterocycles. *Chemistry of heterocyclic compounds*. 2012; 8: 1318–1325 (In Russ.).
3. Chugunova E. A., Mukhamatdinova R. E., Sazykina M. A., Sazykin I. S., Gavrilov N. V., Dobrynin A. B., Kudeevskaya E. M., Burilov A. R. New hybrid compounds based benzofuroxan and sulfonamides. *Journal of General Chemistry*. 2016; 5(86): 767–771 (In Russ.).
4. Chugunova E. A., Mukhamatdinova R. E., Sazykina M. A., Sazykin I. S., Hammami M. I., Akylbekov N. I., Burilov A. R., Kulik N. V., Zobov V. V. Synthesis and biological activity of new hybrid compounds based on benzofuroxans and polyene antibiotics. *Journal of General Chemistry*. 2016; 5 (86): 772–776 (In Russ.).
5. Patent 2255935 of the Russian Federation. 5,7-disubstituted-4,6-dinitrobenzofuroxan with acaricidal and bactericidal activity // Yusupova L. M., Spatlova L. V., Falyakhov I. F., Garipov T. V., Shindala M., Ishkaeva D. R. № 2003119046; declare 06.24.03; publ. 2004. 4 p. (In Russ.).
6. Mironov A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. M.: *Grief and K*. 2012: 197. (In Russ.).
7. Methods of experimental chemotherapy. Ed. G. N. Pershina. M.: *Medicine*. 1971: 526–533. (In Russ.).
8. Belenky, M. L. Elements of quantitative evaluation of the pharmacological effect. M.: *Medicine*. 1963: 262. (In Russ.).

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-16-21
УДК 615.074

Изучение десорбции и высвобождения терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина из эритроцитарных клеточных носителей

О. В. Тринева^{1*}, А. Д. Халахакун¹

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., 1

*Контактное лицо: Тринева Ольга Валерьевна. E-mail: trineevaov@mail.ru

Статья получена: 31.01.2018. Статья принята к печати: 26.04.2019

Резюме

Введение. Сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии были получены модифицированные формы известных в терапии онкологических заболеваний терпено-индольных алкалоидов (ТИА) – винкристина (VCR) и винбластина (VBL) путем их включения в эритроцитарные носители (ЭН) модифицированным методом гипоосмотического лизиса в модифицированной (апротонный растворитель – диметилсульфоксид (ДМСО) и полиэтиленгликоль (ПЭГ 4000) и немодифицированной средах.

Цель. Целью работы являлось изучение десорбции и высвобождения ТИА – VCR и VBL из ранее полученных клеточных ЭН.

Материалы и методы. В проведенном эксперименте определены характеристики высвобождения инкапсулированных препаратов из эритроцитов. Установлено, что в течение 6 ч *in vitro* высвобождается ТИА-препаратов из эритроцитарной формы: VCR – 54,5305%, VCR : ПЭГ-4000 (1:5) – 53,3305%, VCR : PEG-4000 (1:10) – 40,1283%, VCR : ПЭГ-4000 (1:20) – 39,9869%, VCR : ДМСО (2 мг/мл) – 54,2354%, VBL – 68,0656%; VBL : PEG-4000 (1:10) – 63,8941%; VBL : PEG-4000 (1:20) – 60,7455%; VBL : PEG-400 (1:20) – 60,3529%; VBL : ДМСО (2 мг/мл) – 64,5006%. Скорость высвобождения из эритроцитарной формы, инкапсулированной в среде, модифицированной ДМСО, значительно выше, чем инкапсулированных в немодифицированной среде. Средняя скорость высвобождения ТИА из эритроцитарных форм, инкапсулированных в среде ПЭГ приблизительно одинакова.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты показывают, что высвобождение гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитов по сравнению с неинкапсулированными ЭН невелико. Полученные результаты показывают, что из ТИА инкапсулированных ЭН, в среднем, высвобождается $8,242 \pm 0,3135\%$ гемоглобина по сравнению с контрольными эритроцитами – 7,53% после 6 ч инкубирования при 37 °C. Выделения же гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитов в модифицированных средах меньше, чем инкапсулированных в немодифицированной среде.

Заключение. На основе этих результатов можно сделать предложение, что ПЭГ может связываться с эритроцитарной мембраной и стабилизировать ее.

Ключевые слова: винкрисдин, винбластин, клеточные формы противоопухолевых препаратов, адресные системы доставки лекарственных веществ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Тринева О. В., Халахакун А. Д. Изучение десорбции и высвобождения терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина из эритроцитарных клеточных носителей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 16–21.

Study of Desorption and Exemption of Terpeno-indole Alkaloids of Vinkristin and Vinblastin from Erythrocytic Cell Carriers

O. V. Trineeva^{1*}, A. D. Khalahakun¹

1 – Voronezh State University, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

*Corresponding author: Olga V. Trineeva. E-mail: trineevaov@mail.ru

Received: 31.01.2018. Accepted: 26.04.2019

Abstract

Introduction. Employees of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology have obtained modified forms of terpeno-indole alkaloids (TIA) and vincristine (VCR) and vinblastine (VBL) known in the treatment of cancer diseases by incorporating them into the erythrocyte carriers (EN) by the modified method of hypoosmotic lysis in the modified (aprotic solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) and polyethylene glycol (PEG 4000) and unmodified media.

Aim. The aim of the work was to study the desorption and release of terpene-indole vincristine and vinblastine alkaloids from previously obtained cellular erythrocyte carriers.

Materials and methods. In the experiment performed, the release characteristics of encapsulated preparations from erythrocytes were determined. TIA preparations were released from erythrocyte form in 6 hours: VCR – 54.5305%, VCR : PEG-4000 (1:5) – 53.3305%, VCR : PEG-4000 (1:10) – 40.1283%, VCR : PEG-4000 (1:20) – 39.9869%, VCR : DMSO (2 mg/ml) – 54.2354%, VBL – 68.0656%; VBL : PEG-4000 (1:10) – 63.8941%; VBL : PEG-4000 (1:20) – 60.7455%; VBL : PEG-400 (1:20) – 60.3529%; VBL : DMSO (2 mg/ml) – 64.5006%. The rate of release from an erythrocyte form encapsulated in a medium modified with DMSO is significantly higher than that encapsulated in an unmodified medium. The average rate of TIA release from erythrocyte forms encapsulated in PEG medium is approximately the same.

Results and discussion. The results show that the release of hemoglobin from TIA encapsulated erythrocytes compared with non-encapsulated EN is small. The results show that, on average, $8.242 \pm 0.3135\%$ of hemoglobin is released from TIA encapsulated with EN, compared to control erythrocytes – 7.53% after 6 h of incubation at 37 °C. The release of hemoglobin from the TIA of encapsulated erythrocytes in modified media is less than that encapsulated in unmodified medium.

Conclusion. Based on these results, it can be suggested that PEG can bind to the erythrocyte membrane and stabilize it.

Keywords: vincristine, vinblastine, cellular forms of antitumor drugs, targeted drug delivery systems.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Trineeva O. V., Khalahakun A. D. Study of desorption and exemption of terpeno-indole alkaloids of vinkristin and vinblastin from erythrocytic cell carriers. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 16–21.

ВВЕДЕНИЕ

Сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии были получены модифицированные формы известных в терапии онкологических заболеваний терпено-индольных алкалоидов (ТИА) – винкристина (VCR) и винбластина (VBL) путем их включения в эритроцитарные носители (ЭН) [1]. Для получения эритроцитарной клеточной формы VCR и VBL использовали модифицированный метод гипосмотического лизиса. При этом получали ЭН с загруженными ТИА препаратами. «Загрузку» эритроцитов ТИА проводили также при наличии в среде инкубации модифицирующих агентов: апротонного растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля (ПЭГ 4000). Данный способ модификации позволяет решить одновременно проблемы направленного транспорта данных эффективных противоопухолевых препаратов и снижения частоты и силы побочных эффектов, а, следовательно, и увеличения комплаентности больных к назначенному лечению [2–31].

На эффективность загрузки эритроцитов может влиять внутреннее осмотическое давление и внешняя среда эритроцитов. Создание большого переходного осмотического градиента через мембрану эритроцитов может влиять на эффективность инкапсулирования молекулы внутри эритроцитов [7–31]. Рассмотрена возможность применения ПЭГ и ДМСО для создания высокого осмотического градиента через мембрану эритроцитов. ПЭГ препятствует агрегации эритроцитов и обладает свойством скрывать эпитопы антигенов мембраны клеток. Также ПЭГ обеспечивает надежную защиту от воздействия экстремальных факторов окружающей среды и минимизирует повреждения клеточных мембран. ДМСО является апротонным растворителем и применяется в осмотическом импульсном методе загрузки для создания большого переходного осмотического градиента через мембрану эритроцитов [7–31]. В данном эксперименте применяли ДМСО для создания высокой осмотической градиенты в инкубирующей среде.

Цель работы – изучение десорбции и высвобождения терпено-индольных алкалоидов винкристина и винбластина из ранее полученных клеточных эритроцитарных носителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения устойчивости клеточных носителей к возможной десорбции и высвобождению ТИА, а также к выделению гемоглобина в кровеносном русле были проведены следующие исследования. ЭН с включенными VCR и VBL по описанной ранее методике [1] дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида, а затем инкубировали в аутологичной плазме или изотоническом буфере при 37 °С в течение 5 мин, 10 мин, 20 мин, 40 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин, 360 мин. После периода каждой инкубации центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 мин, и собирали определенное количество супернатанта (8,0 мл) для анализа. Содержание ТИА препаратов в супернатанте определялось спектрофотометрически по ранее разработанной методике [32].

Содержание гемоглобина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм. В качестве контрольной пробы применяли изолированные эритроциты, инкубированные в Na-фосфатном буферном растворе с pH=7,4 при 37 °С. Выделение гемоглобина (%) из эритроцитарной формы учитывали по отношению к содержанию гемоглобина в контрольной пробе. К 1,0 мл изолированных эритроцитов добавляли 9,0 мл воды очищенной и проводили полный гемолиз. Полученные данные гемолизата (оптические плотности) считали 100% выделением гемоглобина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики высвобождения VCR из инкапсулированных эритроцитов. Количественное содержание VCR определяли валидированным аналитическим методом [32]. При высокой концентрации ТИА в анализируемой пробе, для получения более достоверного результата, пробы разбавляли очищенной водой, таким образом, чтобы оптическая плотность разбавленного раствора находилась в диапазоне 0,2–0,8. Полученные результаты высвобождения VCR из инкапсулированных эритроцитов представлены в таблицах 1–3 и на рисунке 1.

Таблица 1. Общее количество высвободившегося VCR из различных эритроцитарных форм *in vitro*

Table 1. The total number of released VCR from various erythrocyte forms *in vitro*

Время инкубации (t), мин	Общее количество высвобожденного VCR				
	M (VCR), мкг*	M (VCR : PEG 4000 – 1:5), мкг*	M (VCR : PEG 4000 – 1:10), мкг*	M (VCR : PEG 4000 – 1:20), мкг*	M (VCR : ДМСО – 2 мг/мл), мкг*
5	8,15	32,38	24,14	28,54	26,56
10	47,60	64,69	55,95	59,76	100,49
20	100,46	104,82	93,78	104,77	178,64
40	232,79	198,24	136,62	158,87	260,71
60	396,24	360,79	282,15	256,77	347,52
120	443,22	444,57	366,28	376,88	518,99
240	507,46	540,43	463,97	512,69	660,70
360	569,93	635,00	593,66	591,57	747,01

Примечание. * – среднее значение.

Note. * – average value.

Характеристики высвобождения VBL из инкапсулированных эритроцитов. Полученные результаты высвобождения VBL из инкапсулированных эритроцитов представлены в таблицах 3–5 и на рисунках 2 и 3.

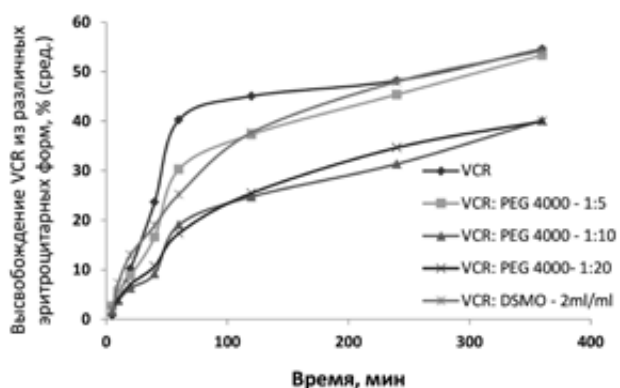


Рисунок 1. График высвобождения VCR из различных эритроцитарных форм *in vitro*

Figure 1. Schedule of VCR release from various erythrocyte forms *in vitro*

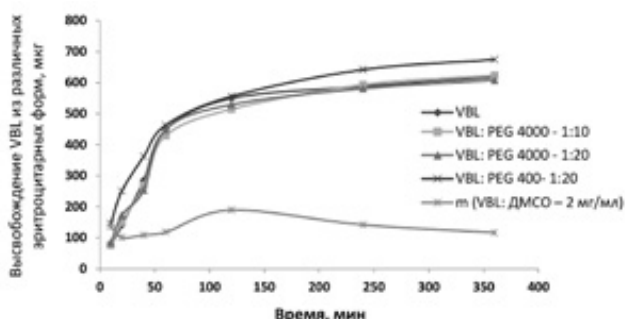


Рисунок 2. График высвобождения общего количества VBL из различных эритроцитарных форм *in vitro*

Figure 2. Schedule of the release of the total number of VBL from various erythrocyte forms *in vitro*

Таблица 2. Общее количество высвободившегося VCR из различных эритроцитарных форм *in vitro*, (%)

Table 2. Total VCR Release from various erythrocyte forms *in vitro*, (%)

Время инкубации (t), мин	Общее количество высвободившегося VCR				
	VCR, %*	VCR : PEG 4000 - 1:5, %*	VCR : PEG 4000 - 1:10, %*	VCR : PEG 4000 - 1:20, %*	VCR : ДМСО - 2 мг/мл, %*
5	0,83	2,72	1,63	1,93	1,93
10	4,84	5,43	3,78	4,04	7,30
20	10,22	8,80	6,34	7,08	12,97
40	23,67	16,65	9,23	10,74	18,93
60	40,29	30,30	19,07	17,36	25,23
120	45,07	37,34	24,76	25,48	37,68
240	48,18	45,39	31,36	34,66	47,97
360	54,53	53,33	40,13	39,99	54,24

Примечание. * – среднее значение.

Note. * – average value.

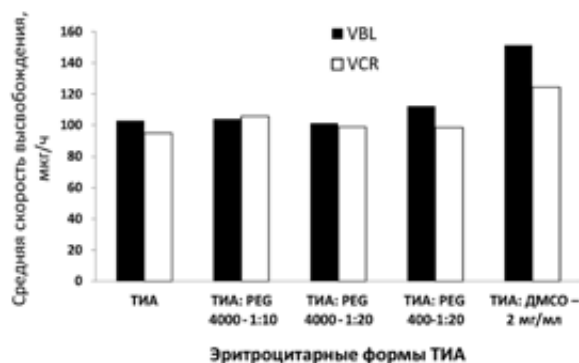


Рисунок 3. Средняя скорость высвобождения ТИА препаратов из инкапсулированных ЭН

Figure 3. The average rate of release of TIA preparations from encapsulated EN

Таблица 3. Общее количество высвободившегося VBL из различных эритроцитарных форм *in vitro*

Table 3. The total number of released VBL from various erythrocyte forms *in vitro*

Время инкубации (t), мин	Общее количество высвободившегося VBL				
	M (VBL), мкг*	M (VBL : PEG 4000 - 1:10), мкг*	M (VBL : PEG 4000 - 1:20), мкг*	M (VBL : PEG 400 - 1:20), мкг*	M (VBL : ДМСО - 2 мг/мл), мкг*
10	75,31	76,62	83,70	146,44	135,10
20	140,22	149,20	171,68	250,18	235,62
40	284,45	268,47	253,34	362,10	343,81
60	448,85	429,10	448,42	462,87	461,46
120	549,33	514,46	529,08	555,72	650,40
240	588,15	593,25	580,97	641,69	792,04
360	617,83	623,59	607,84	674,23	908,24

Примечание. * – среднее значение.

Note. * – average value.

Таблица 4. Общее количество высвободившегося VBL из различных эритроцитарных форм *in vitro* (%)

Table 4. The total number of released VBL from various erythrocyte forms *in vitro* (%)

Время инкубации (t), мин	Общее количество высвободившегося VBL				
	VBL, %*	VBL : PEG 4000 - 1:10, %*	VBL : PEG 4000 - 1:20, %*	VBL : PEG 400 - 1:20, %*	VBL : ДМСО - 2 мг/мл, %*
10	8,30	6,70	8,36	11,59	9,59
20	15,45	13,04	17,16	19,80	16,73
40	31,34	23,47	25,32	28,66	24,42
60	49,45	37,50	44,81	36,63	32,77
120	60,52	44,70	52,87	43,98	46,19
240	64,80	51,85	58,06	50,78	56,25
360	68,07	63,89	60,75	60,35	64,50

Примечание. * – среднее значение.

Note. * – average value.

Таблица 5. Скорость высвобождения ТИА препаратов из инкапсулированных ЭН

Table 5. The rate of release of TIA drugs from encapsulated EN

Метод получения иммобилизованной эритроцитарной формы	Общее количество высвободившегося препарата в течение 6 ч (мкг)*	Средняя скорость высвобождения препарата	
		мкг/мин	мкг/ч
VCR	569,93	1,58	94,99
VCR : PEG 4000 – 1:5	635,00	1,76	105,83
VCR : PEG 4000 – 1:10	593,66	1,65	98,94
VCR : PEG 4000 – 1:20	591,57	1,64	98,59
VCR : ДМСО – 2 мг/мл	747,01	2,08	124,50
VLB	617,83	1,72	102,97
VLB : PEG 4000 – 1:10	623,59	1,73	103,93
VLB : PEG 4000 – 1:20	607,84	1,69	101,31
VLB : PEG 400 – 1:20	674,23	1,87	112,37
VLB : ДМСО – 2 мг/мл	908,24	2,52	151,37

Примечание. * – среднее значение.

Note. * - average value.

Изучение условий высвобождения гемоглобина из ТИА загруженных эритроцитов. Высвобождение гемоглобина из эритроцитов после 6 ч инкубации при 37 °C представлено на рисунке 4.

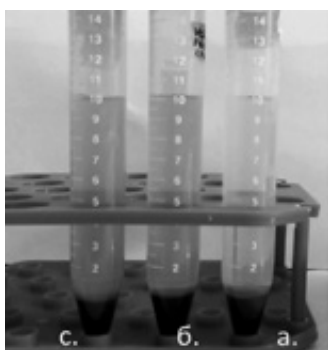


Рисунок 4. Высвобождение гемоглобина после 6 ч инкубации при 37 °C:

а – контрольная проба; б – VCR инкапсулированные эритроциты; в – VBL инкапсулированные эритроциты

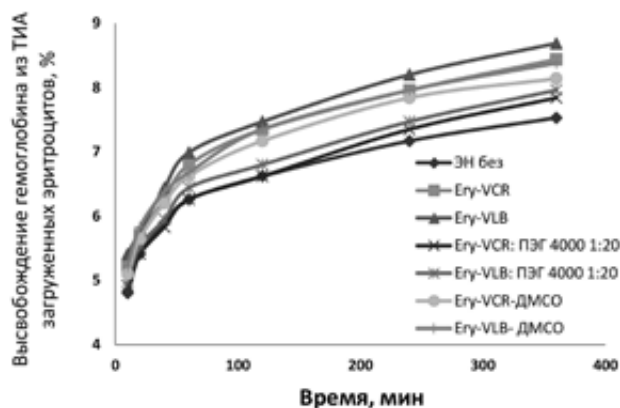
Figure 4. Hemoglobin release after 6 hours of incubation at 37 °C:

а – control sample; б – VCR encapsulated red blood cells; в – VBL encapsulated red blood cells

Изучение условий высвобождения гемоглобина из ТИА загруженных эритроцитов

Полученные результаты высвобождения гемоглобина из инкапсулированных эритроцитов представлены в таблице 6 и на рисунке 5.

Полученные результаты показывают, что высвобождение гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитов по сравнению с неинкапсулиро-

Рисунок 5. Кривые высвобождения гемоглобина (%) из ТИА загруженных эритроцитов *in vitro*Figure 5. Hemoglobin release curves (%) from TIA loaded red blood cells *in vitro*

ванным ЭН невелико. Данный факт свидетельствует о минимальном нарушении цельности эритроцитов в процессе инкапсулирования. Полученные результаты показывают, что из ТИА инкапсулированных ЭН, в среднем, высвобождается $8,242 \pm 0,3135\%$ гемоглобина по сравнению с контрольными эритроцитами – $7,53\%$ после 6 ч инкубирования при 37 °C. Выделение же гемоглобина из ТИА инкапсулированных эритроцитов в модифицированных средах меньше, чем инкапсулированных в немодифицированной среде. На основе этих результатов можно сделать предложение, что ПЭГ может связываться с эритроцитарной мембраной и стабилизировать ее.

Таблица 6. Высвобождение гемоглобина из ТИА загруженных эритроцитов *in vitro*Table 6. The release of hemoglobin from TIA *in vitro* loaded red blood cells

Время инкубации t (мин)	Выделение гемоглобина						
	ЭН – контрольная проба (%)	VCR (%)	VBL (%)	VCR : ПЭГ 4000 – 1:20 (%)	VBL : ПЭГ 4000 – 1:20 (%)	VCR : ДМСО (%)	VBL : ДМСО (%)
10	4,8	5,22	5,41	4,92	4,98	5,1	5,22
20	5,41	5,71	5,77	5,41	5,53	5,65	5,83
40	5,89	6,26	6,44	5,83	5,95	6,2	6,38
60	6,26	6,8	6,99	6,26	6,44	6,62	6,68
120	6,62	7,35	7,47	6,62	6,8	7,17	7,35
240	7,17	7,96	8,2	7,35	7,47	7,84	7,96
360	7,53	8,44	8,69	7,84	7,96	8,14	8,38

Примечание. * – Abs гемолизата – изолированные эритроциты – 1,646.

Note. * - Abs hemolysate - isolated red blood cells - 1,646.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном эксперименте определены характеристики высвобождения, инкапсулированных препаратов из эритроцитов. Установлено, что в течение 6 ч *in vitro* высвобождается ТИА-препаратов из эритроцитарной формы: VCR – 54,5305%, VCR : ПЭГ-4000 (1:5) – 53,3305%, VCR : PEG-4000 (1:10) – 40,1283%, VCR : ПЭГ-4000 (1:20) – 39,9869%, VCR : ДМСО (2 мг/мл) – 54,2354%. VBL – 68,0656%; VBL : PEG-4000 (1:10) – 63,8941%; VBL : PEG-4000 (1:20) – 60,7455%; VBL : PEG-400 (1:20) – 60,3529%; VBL : ДМСО (2 мг/мл) – 64,5006%. Скорость высвобождения из эритроцитарной формы, инкапсулированной в среде, модифицированной ДМСО значительно выше, чем инкапсулированных в немодифицированной среде. Средняя скорость высвобождения ТИА из эритроцитарных форм, инкапсулированных в среде ПЭГ приблизительно одинакова. ПЭГ может инкапсулироваться в эритроциты, поддерживая осмотический градиент эритроцитарной мембраны, а также ПЭГ может поддерживать стабильность мембраны и форму клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тринеева О. В. и др. Морфологические и физико-химические свойства эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 1(22): 40–44.
2. Заборовский А. В., Гуревич К. Г. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть I. Однократное введение. *Сибирский онкологический журнал*. 2017; 1(16): 59–65.
3. Заборовский А. В., Гуревич К. Г. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть II. Многократное введение. *Сибирский онкологический журнал*. 2017; 2(16): 36–41.
4. Ксейко Д. А., Генинг Т. П. Эффективность использования аутологичных клеток крови для адресной доставки в печень аскорбиновой кислоты с целью оптимизации коллоидно-осмотического давления крови после кровопотери. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2014; 2: 67–72.
5. Левин Г. Я., Соснина Л. Н. Использование ультрафиолетового облучения эритроцитов для увеличения их способности депонировать лекарственные препараты. *Медицинский альманах*. 2013; 3(27): 67–69.
6. Левин Г. Я., Соснина Л. Н. Исследование реологических свойств эритроцитов, модифицированных для направленного транспорта лекарственных веществ. *Фундаментальные исследования*. 2013; 2(1): 105–109.
7. Ивонин А. Г. и др. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы. *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2012; 1 (9).
8. Banskota S. et al. Cell-Based Biohybrid Drug Delivery Systems: The Best of the Synthetic and Natural Worlds. 2017; 17(1).
9. Bourgeaux V. et al. Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval. *Drug design, development and therapy*. 2016; 10: 665–676.
10. Coker S. A. et al. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate in Healthy Volunteers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2017.09.001>
11. Deloach J. et al. Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme-loaded erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 1977; 496(2): 507–515.
12. Sun Y. et al. Advances of blood cell-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 96: 115–128.
13. Zocchi E. et al. Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(6): 2040–2044.
14. Rossi L. et al. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 73–87.
15. Villa C. H. et al. Erythrocytes as Carriers for Drug Delivery in Blood Transfusion and Beyond. *Transfusion Medicine Reviews*. 2017; 31(1): 26–35.
16. Kravtsov R. et al. Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse in-vivo studies. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1990; 42(7): 473–476.
17. Field W. N. et al. A comparison of the treatment of thyroidectomized rats with free thyroxine and thyroxine encapsulated in erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989; 51(2): 175–178.
18. Harisa G. E. et al. Characterization of human erythrocytes as potential carrier for pravastatin: An in vitro study. *International Journal of Medical Sciences*. 2011; 8(3): 222–230.
19. Hu C. M. J. et al. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Advanced Healthcare Materials*. 2012; 1(5): 537–547.
20. Favretto M. E. [et al.] Human erythrocytes as drug carriers: Loading efficiency and side effects of hypotonic dialysis, chlorpromazine treatment and fusion with liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2013; 170(3): 343–351.
21. Ihler G. M. Tsang H. C. Hypotonic hemolysis methods for entrapment of agents in resealed erythrocytes. *Methods in enzymology*. 1987; 149: 221–229.
22. Magnani M. et al. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting. Texas. Eurekah.com. 2002; 151.
23. Magnani M., DeLoach J. R. The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors: Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston. *Springer US*. 1992; 341.
24. Skorokhod O. A. et al. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2004; 10(4): 155–164.
25. Bhimavarapu R. et al. Resealed erythrocytes as a targeted drug delivery system – an overview. *PHARMANEST An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2012; 3(1): 47–64.
26. Wu Y. W. et al. Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 54(2): 309–318.
27. Sprandel U. et al. Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine. Boston, MA: *Springer US*. 1997; 149.
28. Sprandel U., Zöllner N. Osmotic fragility of drug carrier erythrocytes. *Research in Experimental Medicine*. 1985; 185(1): 77–85.
29. Thorpe S. R. et al. Enzyme Therapy. V. In Vivo Fate of Erythrocyte-entrapped β -Glucuronidase in β -Glucuronidase-deficient mice. *Pediatric Research*. 1975; 9(12): 918–923.
30. Tuhin F. T. et al. Essentials of Single-Cell Analysis: Series in BioEngineering. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*. 2016; 325–346.
31. Updike S. et al. Asparaginase entrapped in red blood cells: action and survival. *Science*. 1976; 193(4254): 681–683.
32. Халахакун А. Д. Получение и стандартизация эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпено-индольными алкалоидными противоопухолевыми препаратами: автореф. дис. канд. фарм. н. Москва. 2018; 26.

REFERENCES

- Trineeva O. V. et al. Morphological and physicochemical properties of erythrocyte carriers encapsulated with terpene-indole alkaloids. *Drug development & registration*. 2018; 1(22): 40–44 (In Russ.).
- Zaborovsky A. V., Gurevich K. G. Modeling of the directed transport of medicinal substances. Part I. Single management. *Siberian Oncology Journal*. 2017; 1(16): 59–65 (In Russ.).
- Zaborovsky A. V., Gurevich K. G. Modeling of the directed transport of medicinal substances. Part II. Repeated introduction. *Siberian Oncology Journal*. 2017; 2(16): 36–41 (In Russ.).
- Kseiko D. A., Gening T. P. Efficiency of using autologous blood cells for targeted delivery of ascorbic acid to the liver in order to optimize the colloid osmotic pressure of blood after blood loss. *Ulyanovsk Biomedical Journal*. 2014; 2: 67–72 (In Russ.).
- Levin G. Ya., Sosnina L. N. The use of ultraviolet irradiation of erythrocytes to increase their ability to deposit drugs. *Medical Almonas*. 2013; 3(27): 67–69 (In Russ.).
- Levin G. Ya., Sosnina L. N. Investigation of the rheological properties of erythrocytes modified for the directed transport of drugs. *Basic research*. 2013; 2(1): 105–109 (In Russ.).
- Ivonin A. G. and others. Directed transport of drugs: current state of the issue and prospects. *Proceedings of the Komi Scientific Center UB RAS*. 2012; 1(9) (In Russ.).
- Banskota S. et al. Cell-Based Biohybrid Drug Delivery Systems: The Best of the Synthetic and Natural Worlds. 2017; 17(1).
- Bourgeaux V. et al. Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval. *Drug design, development and therapy*. 2016; 10: 665–676.
- Coker S. A. et al. A Study of the Pharmacokinetic Properties and the In Vivo Kinetics of Erythrocytes Loaded With Dexamethasone Sodium Phosphate in Healthy Volunteers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2017.09.001>
- DeLoach J. et al. Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme-loaded erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 1977; 496(2): 507–515.
- Sun Y. et al. Advances of blood cell-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 96: 115–128.
- Zocchi E. et al. Encapsulation of doxorubicin in liver-targeted erythrocytes increases the therapeutic index of the drug in a murine metastatic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(6): 2040–2044.
- Rossi L. et al. Engineering erythrocytes for the modulation of drugs' and contrasting agents' pharmacokinetics and biodistribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 106: 73–87.
- Villa C. H. et al. Erythrocytes as Carriers for Drug Delivery in Blood Transfusion and Beyond. *Transfusion Medicine Reviews*. 2017; 31(1): 26–35.
- Kravtsoff R. et al. Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse in-vivo studies. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1990; 42(7): 473–476.
- Field W. N. et al. A comparison of the treatment of thyroidectomized rats with free thyroxine and thyroxine encapsulated in erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989; 51(2): 175–178.
- Harisa G. E. et al. Characterization of human erythrocytes as potential carrier for pravastatin: An in vitro study. *International Journal of Medical Sciences*. 2011; 8(3): 222–230.
- Hu C. M. J. et al. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Advanced Healthcare Materials*. 2012; 1(5): 537–547.
- Favretto M. E. [et al.] Human erythrocytes as drug carriers: Loading efficiency and side effects of hypotonic dialysis, chlorpromazine treatment and fusion with liposomes. *Journal of Controlled Release*. 2013; 170(3): 343–351.
- Ihler G. M., Tsang H. C. Hypotonic hemolysis methods for entrapment of agents in resealed erythrocytes. *Methods in enzymology*. 1987; 149: 221–229.
- Magnani M. et al. Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting. Texas. Eurekah.com. 2002; 151.
- Magnani M., DeLoach J. R. The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors: Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston. *Springer US*. 1992; 341.
- Skorokhod O. A. et al. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2004; 10(4): 155–164.
- Bhimavarapu R. et al. Resealed erythrocytes as a targeted drug delivery system – an overview. *PHARMANEST An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2012; 3(1): 47–64.
- Wu Y. W. et al. Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 54(2): 309–318.
- Sprandel U. et al. Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine. Boston, MA: *Springer US*. 1997; 149.
- Sprandel U., Zöllner N. Osmotic fragility of drug carrier erythrocytes. *Research in Experimental Medicine*. 1985; 185(1): 77–85.
- Thorpe S. R. et al. Enzyme Therapy. V. In Vivo Fate of Erythrocyte-entrapped β -Glucuronidase in β -Glucuronidase-deficient mice. *Pediatric Research*. 1975; 9(12): 918–923.
- Tuhin F. T. et al. Essentials of Single-Cell Analysis: Series in BioEngineering. Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*. 2016; 325–346.
- Updike S. et al. Asparaginase entrapped in red blood cells: action and survival. *Science*. 1976; 193(4254): 681–683.
- Halakhakun A. D. Production and standardization of erythrocyte carriers encapsulated with terpene-indole alkaloid antineoplastic drugs: Sc.D. Moscow. 2018; 26.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-22-26
УДК 615.2

Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой для профилактики гриппа и ОРВИ

А. С. Карпова^{1,2*}, Ю. В. Кочкина^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}

1 – «МИРЭА – Российский технологический университет», 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86
2 – АО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, оф. 1

*Контактное лицо: Карпова Анастасия С. E-mail: karpova@ipt.ru.com

Статья получена: 27.02.2018. Статья принята к печати: 07.05.2019

Резюме

Введение. Грипп и острая респираторная вирусная инфекция (далее – ОРВИ) являются тяжелыми заболеваниями, от которых ежегодно страдают до 500 миллионов человек во всем мире. В России ежегодно регистрируют от 27,3 до 41,2 миллионов заболевших. Таким образом актуальной задачей является разработка новых эффективных лекарственных средств, направленных на профилактику и лечение вышеуказанных заболеваний. Предложен состав лекарственного препарата на основе аминокaproновой кислоты, обладающей противовирусной активностью, и сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина с доказанным иммуностимулирующим действием для интраназального применения.

Цель. Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой и сополимером N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина.

Материалы и методы. Для решения поставленной цели использовали препараты с разным соотношением активных веществ для выявления наилучшей эффективности. Исследование проводили в сравнении с известным препаратом занамивира. Противовирусную активность изучали в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) у белых беспородных мышей при назальном введении исследуемых образцов. Активность исследуемых препаратов оценивали по весовым показателям и динамике гибели животных контрольных и опытных групп. Также оценивали инфекционную активность вируса в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы на культуре клеток MDCK в питательной среде MEM. Титр вируса выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса ($\lg \text{TCID}_{50}$) на 200 мкл среды.

Результаты и обсуждение. Согласно данным, полученным в ходе исследования динамики весовых показателей и динамики гибели животных, максимальную противовирусную активность показал препарат с соотношением активных веществ 2:1, что подтверждают данные изучения вирусной активности в легких животных, титр вируса составил $1,9 \pm 0,3$ ($p=0,616$) $\lg \text{TCID}_{50}/0,2$ мл, таким образом данный испытуемый образец снизил уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы.

Заключение. В ходе проделанной работы изучена противовирусная активность комплексного препарата на основе аминокaproновой кислоты и сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина и выявлено, что препарат с соотношением активных веществ 2:1 снижает уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы. Таким образом данная комбинация активных веществ может быть использована для разработки перспективного лекарственного препарата для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ при назальном применении.

Ключевые слова: аминокaproновая кислота, сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, противовирусная активность, профилактика гриппа и ОРВИ, назальный спрей.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Карпова А. С., Кочкина Ю. В., Кедик С. А. Изучение противовирусной активности комплексного препарата с аминокaproновой кислотой для профилактики гриппа и ОРВИ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 22–26.

The Antiviral Activity Study of Complex Drug with Aminocaproic Acid for Prevention of Influenza and ARVI

A. S. Karpova^{1,2*}, Y. V. Kochkina^{1,2}, S. A. Kedik^{1,2}

1 – «MIREA – Russian Technical University», 86, Vernadskogo highway, Moscow, 119571, Russia
2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technology», of. 1, 21, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

*Corresponding author: Anastasiya S. Karpova. E-mail: karpova@ipt.ru.com

Received: 27.02.2018. Accepted: 07.05.2019

Abstract

Introduction. Influenza and acute respiratory viral infection (hereinafter – ARVI) are serious diseases that affect up to 500 million people worldwide every year. From 27.3 to 41.2 million people are registered annually in Russia. Thus, the urgent task is to develop new effective drugs aimed at the prevention and treatment of the above diseases. The drug composition for intranasal use based on aminocaproic acid with antiviral activity and a copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine with a proven immunostimulating action was developed.

Aim. Study of the antiviral activity of the complex drug composition with aminocaproic acid and a copolymer of N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine.

Materials and methods. To reach this goal, preparations with different ratios of active substances were used to identify the best efficacy. The study was conducted in comparison with the known drug zanamivir. Antiviral activity was studied against influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus in white outbred mice upon nasal administration of the test samples. The activity evaluation of the studied drugs was carried out according to the weight values and the death dynamics control and experimental groups of animals. Infectious activity of the virus in the lung tissue of animals was assessed on day 5 after infection by titration on a culture of MDCK cells in a nutrient medium MEM. Virus titer was expressed in logarithm of 50% of the virus experimental infectious dose ($\lg \text{TCID}_{50}$) per 200 μl of medium.

Results and discussion. Based on the data obtained during the study of the weight values dynamics and the dynamics of animal death, the drug showed a maximum antiviral activity with a 2:1 ratio of active substances, which is confirmed by the data on viral activity in the lungs of animals, the virus titer was 1.9 ± 0.3 ($p=0.616$) $\lg \text{TCID}_{50}/0.2$ ml.

Conclusion. Antiviral activity of the complex preparation based on aminocaproic acid and N-vinylpyrrolidone and 2-methyl-5-vinylpyridine copolymer was studied, the most effective ratio of active substances was found, it is 2:1. Thus this complex preparation with a ratio of active substances 2:1 reduced the viral load level in the lung tissue of infected mice by more than two times relative to the control group. Therefore, this combination of active substances can be used to develop a promising drug for nasal use as treatment and prevention of influenza and ARVI.

Keywords: aminocaproic acid, copolymer of 2-methyl-5-vinylpyridine and N-vinylpyrrolidone, antiviral activity, prevention of influenza and ARVI, nasal spray.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Karpova A. S., Kedik S. A., Kochkina Y. V. The antiviral activity study of complex drug with aminocaproic acid for prevention of influenza and ARVI. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 22–26.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – это острое инфекционное заболевание дыхательных путей, вызываемое вирусом, которое входит в группу острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). В настоящее время известно более 2000 различных типов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром. Кроме вируса гриппа на сегодняшний день описано более 200 видов респираторных вирусов, таких как аденовирусы, риновирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, вызывающих гриппоподобные заболевания у человека. В тяжелых случаях грипп может распространяться в виде эпидемий и пандемий [1].

Вирусные инфекции дыхательных путей являются тяжелой болезнью, от которой в 2015 г. в мире умерли 3,2 млн человек [2]. Следовательно, существует потребность в разработке новых лекарственных препаратов, направленных на борьбу с гриппом и ОРВИ.

В качестве активных веществ разрабатываемого лекарственного препарата предложены аминокaproновая кислота (далее – АКК) и сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (далее – сополимер). АКК зарегистрирована в России в качестве фибринолитического средства в виде раствора для инфузий при хирургических операциях. Однако известны и ее противовирусные свойства, врачи назначают ее больным в виде раствора для ингаляций во время вирусных заболеваний, а также для профилактики. АКК в форме назальных капель зарегистрирована в Украине, противовирусное действие которых описано в литературных источниках [3, 4]. Механизм действия аминокaproновой кислоты заключается в предотвращении проникновения вируса в клетки слизистой оболочки носоглотки. Она на ранних этапах блокирует взаимодействие вируса с мембранами здоровых клеток человека, подавляя протеолитический процессинг гемогглютинаина [5].

Тогда как сополимер с содержанием мономерных звеньев $n=25-50$ мольн. %, и средневязкостной молекулярной массой $M_{\text{ср}}=15-28$ кДа имеет доказанное иммуностимулирующее действие [6].

Таким образом АКК и сополимер являются перспективными веществами для создания на их основе лекарственного препарата для профилактики гриппа

и ОРВИ, так как ожидается, что АКК будет проявлять краткосрочный противовирусный эффект, а сополимер будет оказывать общее иммуностимулирующее действие.

Цель исследования заключалась в выявлении противовирусной активности у кандидатных препаратов с разным соотношением активных веществ. Объем исследований определялся действующими нормативными документами [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были АКК (ООО «Полисинтез, Россия, серия 571016, годен до 11.2021), сополимер (АО «ИФТ», Россия, содержание звеньев 32 мол. %, молекулярная масса 27 кДа), также были использованы калия дигидрофосфат х.ч. (Химмед, Россия), динатрия гидрофосфат х.ч. (Химмед, Россия), бензалкония хлорид (Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP), вода очищенная (ФС 2.2.0020.15). В качестве положительного контроля (препарат сравнения) использовали препарат «Реленза» порошок для ингаляций, 5 мг, производства фирмы Глаксосмиткляйн, Великобритания, серия МА8Т, срок годности до 01.02.2023 г. (МНН занамивир) (далее по тексту занамивир).

Для исследования было предложено три кандидатных препарата с разным соотношением активных веществ: Препарат 1 – 1:1, препарат 2 – 1:2, препарат 3 – 2:1 с соотношением аминокaproновой кислоты и сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона соответственно. Образцы препаратов готовили в фосфатном буферном растворе pH 5,5 с добавлением консерванта – бензалкония хлорида.

В ходе проводимых исследований оценку активности кандидатных препаратов проводили по трем параметрам:

- оценка динамики весовых показателей животных контрольных и опытных групп;
- оценка динамики гибели животных контрольных и опытных групп;
- оценка инфекционной активности вируса в ткани легких животных контрольных и опытных групп на 5 сутки после инфицирования.

Оценку проводили при заражении мышей модельным вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H_1N_1), полученном из музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ Гриппа Министерства здравоохранения РФ.

Работы по изучению противовирусной активности предлагаемого лекарственного средства выполнялись на самках белых беспородных мышей массой 16–18 г, полученных из питомника «Рапполово» Ленинградской области. Экспериментальных животных разделили на группы по вводимым веществам, а также группы отрицательного и положительного контроля по 20 особей в каждой группе (таблица 1).

Таблица 1. Схема применения образцов у мышей

Table 1. Pattern of use of samples in mice

№ п/п	Группы	Животные	Введение образцов	Инфицирование через 3 часа
1	Препарат 1	20 мышей	X	X
2	Препарат 2	20 мышей	X	X
3	Препарат 3	20 мышей	X	X
4	Контроль +	20 мышей	X	X
5	Контроль –	20 мышей	Физ.р-р	X
6	Здоровые	20 мышей		

За 3 часа до заражения мыши первых трех групп получали исследуемые образцы. Мыши группы положительного контроля получали препарат с известной противовирусной активностью, мыши группы отрицательного контроля получали физиологический раствор, последняя группа – незараженные мыши. В качестве препарата для положительного контроля подбирают лекарственное средство с известной и доказанной противовирусной активностью схожего механизма действия, в данном случае использовали препарат на основе субстанции занамивира – зарегистрированного в РФ лекарственного средства, обладающего противовирусной активностью.

Образцы вводили в объеме 10 мкл на мыш. Введение вирусного инокулята осуществляли под легким эфирным наркозом в дозе 5×10^3 TCID₅₀ на мыш в объеме 15 мкл.

Животные каждой испытываемой группы содержались в двух отдельных клетках: для учета динамики массы тела (15 животных) и забора органов (5 животных). Наблюдение за животными осуществляли в течение двух недель. Ежедневно проводили изучение динамики массы тела и фиксировали гибель животных. На основании полученных показателей выживаемости в каждой группе рассчитывали следующие показатели [8]:

1. Процент гибели: M_r – отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе,
2. Индекс защиты: IP – отношение разницы доли погибших животных в контрольной и подопытной группах к доле погибших животных в контрольной группе в соответствии со следующими формулами:

$$M_r = M/N_t,$$

где M – число животных в группе, павших в течение 14 дней после заражения; N_t – общее число павших животных в группе.

$$IP = ((M_c - M_e)/M_c) \times 100\%,$$

где M_c и M_e – доля погибших животных в контрольной и опытной группах соответственно.

Для оценки специфической фармакологической активности образцов препаратов на 3-й день после заражения по 5 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие, гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (Qiagen, США) и определяли в гомогенатах инфекционную активность вируса. Для оценки уровня репродукции вируса в ткани легких проводили титрование его инфекционной активности в культуре клеток MDCK, коллекции ATCC CCL-34 (106 кл./мл), полученной из лаборатории клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа».

Из гомогената легочной ткани готовили серию 10-кратных разведений на среде MEM (ООО «Биолот», Россия) с добавлением трипсина (Sigma Aldrich, USA, 1 мкг/мл) и антибиотика ципрофлоксацина (ОАО «Синтез», Россия, 20 мкг/мл) и вносили их в лунки планшета с клетками MDCK. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при температуре 37 °C в атмосфере 5% диоксида углерода. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшетов с круглым дном для иммунологических реакций и добавляли по 100 мкл на лунку 1% суспензии куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты выдерживали 1 час при температуре 20 °C, после чего визуально оценивали наличие или отсутствие гемагглютинации в лунках. За титр вируса принимали максимальное разведение ткани, при котором в лунках отмечается гемагглютинация. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) эритроцитов. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации и выражали в логарифмах 50% экспериментальной инфекционной дозы вируса (\lg TCID₅₀) на 200 мкл среды.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Полученные результаты представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) или ошибка эксперимента ($M \pm SE$). Достоверность различий в титрах вируса в лёгких оценивали при помощи критерия Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка динамики весовых показателей животных

Результаты исследований веса испытываемых животных подтверждают, что инфицирование вируса гриппа приводит к развитию у животных патологического

процесса. Внешние признаки заболевания проявлялись в ограничении подвижности животных, снижении потребления корма и воды, приводящему к потере веса и гибели животных, мыши, которых не заражали вирусом, не теряли в весе на протяжении всего исследования (таблицы 2, 3; рисунок 1).

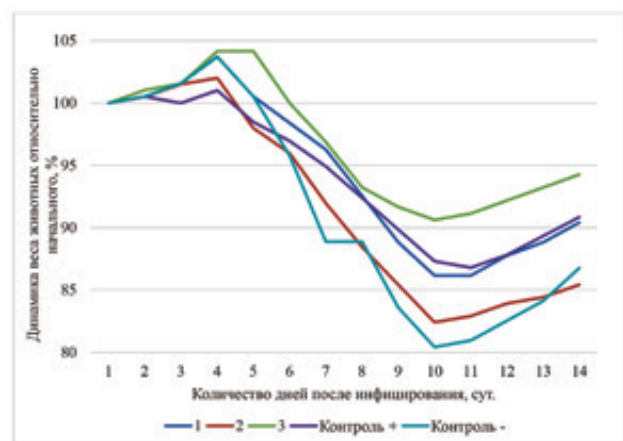


Рисунок 1. Динамика веса животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) в условиях применения препаратов за 3 часа перед инфицированием

Figure 1. The dynamics of animal weight during influenza pneumonia caused by the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) virus under the conditions of using the drugs 3 hours before infection

Оценка динамики гибели животных

Препарат сравнения приводил к снижению специфической смертности животных на 55 %. Исследуемые препараты, 1 и 2, снижали процент гибели мышей на 22% по сравнению с отрицательным контролем. В то

время как исследуемый образец 3 снизил показатель смертности на 67% по сравнению с группой мышей отрицательного контроля (таблица 3, рисунок 2). Из группы здоровых не зараженных мышей ни одна особь не погибла.

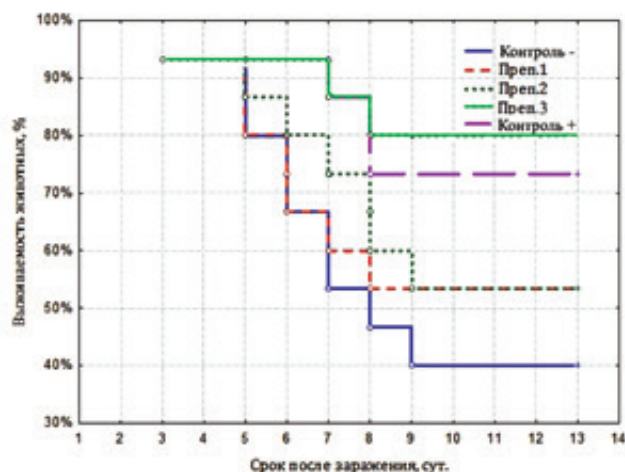


Рисунок 2. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии в условиях интраназального применения исследуемых образцов

Figure 2. The dynamics of the death of animals during influenza pneumonia in the conditions of intranasal use of the samples

Оценка инфекционной активности вируса в ткани легких испытываемых животных

Результаты, полученные в ходе оценки гибели испытываемых животных, подтвердили изучением вирусной активности в легких животных исследуемых групп (таблица 4).

Таблица 2. Оценка динамики веса испытываемых животных

Table 2. Evaluation of the weight dynamics of the test animals

Образец	Вес животных (г), на сутки после инфицирования									
	0	1	2	3	5	6	7	9	12	13
1	19,9±1,3	20,0±1,3	20,2±2,2	20,3±2,9	19,1±3,9	18,3±4,1	17,6±4,2	16,4±3,6	17,4±3,3	17,8±2,0
2	19,2±1,3	19,4±1,4	19,5±1,9	20,0±2,4	19,2±2,7	18,6±2,8	17,9±3,0	17,4±3,2	17,9±3,2	18,1±1,8
3	19,7±1,5	19,8±1,5	19,7±2,0	19,9±2,3	19,1±3,2	18,7±3,0	18,2±3,5	17,2±2,8	17,6±3,0	17,9±1,3
4	18,8±1,3	18,9±1,3	19,1±2,1	19,5±2,6	18,5±3,1	18,1±4,0	17,4±4,1	16,2±3,1	16,7±3,0	17,0±2,3
Контроль	18,9±2,2	19,0±1,6	19,2±2,3	19,6±2,7	18,1±3,9	16,8±3,8	16,8±3,8	15,2±3,6	15,9±3,7	16,4±1,0

Таблица 3. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии в условиях интраназального применения исследуемых образцов

Table 3. The dynamics of the death of animals during influenza pneumonia in the conditions of intranasal use of the samples

Образец	Дни исследования										Кол-во павших животных	Смертность, %	Индекс защиты, %
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1			3	2	1	1					7	47	22
2	1		1	1	1	2	1				7	47	22
3	1				1	1					3	20	67
Контроль +					2	2					4	27	55
Контроль -			3	2	2	1	1				9	60	-

Таблица 4. Уровень репродукции вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) в условиях применения изучаемых препаратов за 3 часа до заражения

Table 4. The level of reproduction of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H₁N₁) virus under the conditions of use of the studied drugs 3 hours before infection

Образец	Титр вируса в ткани легких (lg TCID ₅₀ /0,2 мл)
Исследуемый образец 1 (n=5)	2,9±0,4 (p=0,036)
Исследуемый образец 2 (n=5)	2,7±0,2 (p=0,042)
Исследуемый образец 3 (n=5)	1,9±0,3 (p=0,031)
Контроль + (n=5)	2,2±0,3 (p=0,023)
Контроль – (n=5)	3,9±0,2

Из представленных данных видно, что, как препарат сравнения, так и изучаемые экспериментальные образцы снижали вирусную нагрузку в ткани легких мышей. Были получены достоверные отличия от группы отрицательного контроля, как при использовании занамивира, так и при использовании исследуемых препаратов. Из исследуемых образцов максимальную активность проявил исследуемый образец 3, снизивший уровень вирусной нагрузки в ткани легких зараженных мышей более чем в два раза относительно контрольной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что раствор, содержащий аминокaproновую кислоту и сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона имеет противовирусную активность и может быть использован в качестве разработки перспективного лекарственного препарата для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ при интраназальном применении. Наиболее эффективным является состав препарата с соотношением активных компонентов 2:1, подавлявший размножение вируса в легких белых беспородных мышей более чем в два раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бюллетень Всемирной организации здравоохранения. 2012; 90(4): 245–320.
2. Nair H., Brooks W., Katz M., Roca A., Berkley J., Madhi S. et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2011; 378(9807): 1917–1930. Doi: 10.1016/s0140-6736(11)61051-9.
3. Serkedjieva J., Nikolova E., Kirilov N. Synergistic inhibition of Influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and ε-aminocaproic acid in vitro and in vivo. *Acta Virologica*. 2010; 54(2): 137–145. Doi: 10.4149/av_2010_02_137.
4. Рыбалко С. Л., Краснобаев Е. А., Жеребцова Э. Н. и др. Современное состояние проблемы гриппа А H1N1 2009. Украина. Здоров'я нації. 2010; 3(15): 169–178.
5. Lozitsky V. Anti-Infectious Actions of Proteolysis Inhibitor ε-Aminocaproic Acid (ε-ACA). National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. 2008; 193–198. Doi: 10.1007/978-1-59745-569-5_20.
6. Патент Российской Федерации №20000004, кл. C08F 226/10, A61K 31/79, опубл. 15.02.1993.
7. Миронов А. Н. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств. Т. 1. – М.: ФГБУ «НЦЭСМП». 2012; 942.

8. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, – М.: Медицина. 2005; 832.

REFERENCES

1. Bulletin of the World Health Organization. 2012; 90(4): 245–320 (In Russ.).
2. Nair H., Brooks W., Katz M., Roca A., Berkley J., Madhi S. et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2011; 378(9807): 1917–1930. Doi: 10.1016/s0140-6736(11)61051-9.
3. Serkedjieva J., Nikolova E., Kirilov N. Synergistic inhibition of Influenza A virus replication by a plant polyphenol-rich extract and ε-aminocaproic acid in vitro and in vivo. *Acta Virologica*. 2010; 54(2): 137–145. Doi: 10.4149/av_2010_02_137.
4. Rybalko S. L., Krasnobaev E. A., Zherebtsova E. N. et al. The current state of the H1N1 2009 flu problem. *Ukraine. Health of the Nation*. 2010; 3 (15): 169–178 (In Russ.).
5. Lozitsky V. Anti-Infectious Actions of Proteolysis Inhibitor ε-Aminocaproic Acid (ε-ACA). National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. 2008; 193–198. Doi: 10.1007/978-1-59745-569-5_20.
6. Patent of the Russian Federation №20000004, cl. C08F 226/10, A61K 31/79, publ. 02/15/1993 (In Russ.).
7. Mironov A. N. Manual for preclinical studies drugs. T. 1. – М.: FGBU «NCEHMS». 2012; 942. (In Russ.).
8. Khabriev P. U. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. М.: Medicine. 2005; 832 (In Russ.).

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-27-31
УДК 615.014.2

Изучение вязкости раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей

С. И. Косенкова^{1*}, И. И. Краснюк¹, И. И. Краснюк (мл.)¹

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

*Контактное лицо: Косенкова Светлана Игоревна. E-mail: sv-omega@yandex.ru

Статья получена: 10.10.2018. Статья принята к печати: 02.11.2018

Резюме

Введение. Нафтифин гидрохлорид – противогрибковый препарат из группы аллиламинов, который применяется в качестве препарата для наружного использования при лечении онихомикоза. Быстро проникает в кожу и ногти. Оказывает противогрибковое, антибактериальное и противовоспалительное действие. Имеет широкий спектр действия в отношении многих грибов, вызывающих онихомикозы (дерматофиты, плесневые и дрожжевые грибки). Дополнительно оказывает антибактериальное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, позволяет снизить риск осложненного течения заболевания. Обладает выраженным противовоспалительным действием. Полиэтиленгликоли относятся к классу органических полимеров этиленгликоля. Полиэтиленгликоли безопасны и широко применяются в фармацевтическом производстве, за счет многообразия применения. Объектом исследования является ряд растворов нафтифина гидрохлорида в различной комбинации и с различным соотношением полиэтиленгликолей.

Цель. Цель работы: подобрать оптимальный состав раствора нафтифина гидрохлорида, добиться за счет вязкости пролонгирующего действия раствора, а также определить время течения для выбора лекарственной формы с максимальной вязкостью.

Материалы и методы. Для определения вязкости данного раствора использован метод капиллярной вискозиметрии на аппарате ВПЖ-2. В качестве раствора сравнения использован раствор «Экзодерил».

Результаты и обсуждение. Чередуя различные комбинации полиэтиленгликоля, мы повысили вязкость раствора нафтифина гидрохлорида, благодаря чему добились более точного способа нанесения лекарственных веществ. В ходе исследования определили, что раствор «Экзодерил» обладает минимальной вязкостью, по сравнению со всеми образцами исследуемых растворов.

Заключение. Оптимальная вязкость раствора нафтифина гидрохлорида обеспечивает пролонгированное действие препарата, за счет более длительного нахождения на ногтевой пластине. Вязкость позволяет обеспечить более точное нанесение на поврежденный ноготь, и снижает потерю концентрации действующего вещества. Увлажняющие свойства полиэтиленгликолей помогут снизить выраженность побочных эффектов (сухость, раздражение), и обеспечить более длительное и комфортное лечение онихомикоза.

Ключевые слова: гидрохлорид нафтифина, полиэтиленгликоль, вискозиметрия, раствор, полимеры.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк (мл) И. И. Изучение вязкости раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 27–31.

The Viscosity Study of Naftifine Hydrochloride Solution with a Combination of Polyethylene Glycols

S. I. Kosenkova¹, I. I. Krasnyuk¹, I. I. Krasnyuk (jr.)¹

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

*Corresponding author: Svetlana I. Kosenkova. E-mail: sv-omega@yandex.ru

Received: 10.10.2018. Accepted: 02.11.2018

Abstract

Introduction. Naftifin hydrochloride is an antifungal drug from the allylamine group, which is used as a drug for external use in the treatment of onychomycosis. Quickly penetrates the skin and nails. It has antifungal, antibacterial and anti-inflammatory effects. It has a wide range of actions against many fungi that cause onychomycosis (dermatophytes, molds and yeast). In addition, it has an antibacterial effect in the ratio of gram-positive and gram-negative bacteria, reduces the risk of complicated course of the disease. It has a pronounced anti-inflammatory effect. Polyethylene glycols belong to the class of organic polymers of ethylene glycol. Polyethylene glycols are safe and widely used in pharmaceutical production, due to the variety of applications. The object of the study is a number of solutions of naftifin hydrochloride in different combinations and with different ratios of polyethylene glycols.

Aim. The purpose of the work is to choose the optimal composition of the solution of naftifin hydrochloride. Achieve due to the viscosity of the prolonging action of the solution. Depending on the molecular weight of polyethylene glycol to determine the flow time of solutions. Choose among a number of samples with different ratios of polyethylene glycols, a solution with maximum viscosity.

Materials and methods. To determine the viscosity of this solution, a capillary viscometry method was used on the vpzh-2 apparatus. «Exoderil» solution was chosen as a reference formulation.

Results and discussion. Alternating different combinations of polyethylene glycol, we have increased the viscosity of the fluid naftifine hydrochloride, which has achieved a more accurate method of application of medicinal substances. During the study, it was determined that the solution «Exoderil» has a minimum viscosity, compared with all samples of the studied solutions.

Conclusion. The optimal viscosity of the solution of naftifin hydrochloride provides a prolonged action of the drug, due to a longer stay on the nail plate. Viscosity allows for more accurate application to the damaged nail, and reduces the loss of concentration of the active substance. Moisturizing properties of polyethylene glycols will help to reduce the severity of side effects (dryness, rarefaction), and provide a longer and more comfortable treatment of onychomycosis.

Keywords: naftifin hydrochloride, polyethylene glycol, viscosimetry, solution, polymers.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk (ml) I. I. The viscosity study of naftifine hydrochloride solution with a combination of polyethylene glycols. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 27–31.

ВВЕДЕНИЕ

Нафтифин гидрохлорид – противогрибковый препарат из группы аллиламинов, который применяется в качестве препарата для наружного использования при лечении онихомикоза. В настоящее время на фармацевтическом рынке имеется ряд препаратов, содержащих нафтифин гидрохлорид, но имеющих водно-спиртовую основу. Эти препараты имеют достаточно жидкую консистенцию, за счет чего увеличивается расход препарата. Эти препараты вызывают ряд побочных эффектов в виде местных реакций: сухости кожи, покраснений, жжения, зуда и раздражения. Это доставляет дополнительные неудобства при лечении онихомикоза. При онихомикозах раствор нафтифина применяют дважды в день, в течение 6 месяцев, а именно до полного отрастания ногтевой пластины [1].

Использование полиэтиленгликолей (ПЭГ) для увеличения вязкости раствора нафтифина гидрохлорида, является наиболее рациональным решением. Полиэтиленгликоли – полимер этиленгликоля, которые являются инертными, нетоксичными и биоразлагаемыми органическими полимерами, имеющими большое значение в областях биотехнологии и фармации. Уже на протяжении многих лет ПЭГи используются в фармацевтической промышленности, и являются безопасными для человека. Они зарегистрированы и описаны в мировых фармакопеях [2]. В промышленных масштабах ПЭГ получают в лабораторных условиях путем полимеризации окиси этилена с помощью гликолей и щелочных катализаторов. Полученное соединение, в зависимости от молекулярной массы, может иметь одно из трех агрегатных состояний: вязкая жидкость, твердое или пастообразное вещество (таблица 1). Одной из самых характерных особенностей растворов полиэтиленгликолей является вязкость, очень высокая по сравнению с растворами низкомолекулярных веществ, непостоянная при разных скоростях течения, сильно зависящая от температуры, нелинейно изменяющаяся с концентрацией раствора и связанная с молекулярным весом полимера определенными соотношениями [3].

Таблица 1. Полученное соединение, в зависимости от молекулярной массы

Table 1. The resulting compound, depending by molecular weight

Лекарственная форма	Молекулярная масса ПЭГ
Жидкие / пастообразные формы	300, 400, 600, 800, 1000
Чешуйки (хлопья)	1500, 2000, 3000, 3350, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 20000, 35000
Порошок (перемолотые или гранулированные чешуйки)	3000, 3350, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 20000
Мелкий порошок, (перемолотые или гранулированные чешуйки)	3350, 4000, 6000, 8000
Порошок полученный путем распылительной сушки	3350, 4000

Особенности вязкости растворов полимеров были предметом тщательного изучения в течение долгого времени. Но даже сейчас еще не вполне ясна природа этих особенностей, да и закономерности в их проявлении нельзя считать достаточно изученными. Но установленные факты и теоретические расчеты позволяют изучать полимеры и контролировать технологические процессы их получения. Успехи последних лет в изучении вязкости растворов полимеров в значительной степени обязаны достижениям в области теории строения жидкости и механизма вязкости жидкостей [4].

При исследовании вязкости растворов полимеров наблюдаются различные аномальные явления: вязкость изменяется во времени, вязкость зависит от состава раствора и, наконец, коэффициент вязкости не является постоянной величиной, а зависит от градиента скорости или от приложенного давления. Первые два аномальных изменения вязкости являются следствием неравновесности раствора. Что касается зависимости от градиента скорости, то она свидетельствует о неподчинении концентрированных растворов закону Ньютона; вначале вязкость уменьшается с ростом давления, а при дальнейшем увеличении давления остается постоянной [5, 6].

В растворах, не подчиняющихся закону Ньютона, наблюдаются также отклонения от закона Пуазейля; количество жидкости, протекающей через капилляр, растет не пропорционально давлению, как это должно было быть по закону Пуазейля, а быстрее. При этом отклонения от закона Пуазейля не связаны с переходом от ламинарного к турбулентному течению [7]. Известно, что критическая скорость или критическое давление, выше которого течение становится турбулентным, при одном и том же радиусе капилляра тем больше, чем выше вязкость жидкости. В концентрированных растворах полимеров вязкость жидкости настолько велика, что значения критических давлений должны быть очень большими. При тех давлениях, которые применяются на практике, течение продолжает оставаться ламинарным, но растворы не подчиняются уравнению Ньютона [8]. Объяснение этого уравнения находят в образовании структур в растворах полимеров, и часто повышенную аномальную вязкость раствора называют структурной вязкостью.

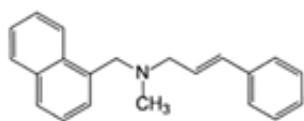
Понижение вязкости раствора при увеличении давления, то есть скорости течения, может происходить, например, если шарообразные частицы, находящиеся в растворе, способны деформироваться, принимая обтекаемую удлиненную форму [9]. Отклонения от законов Ньютона и Пуазейля особенно резко проявляются в том случае, когда в растворе находятся удлиненные палочкообразные частицы. В состоянии покоя или при малых градиентах скоростей вероятность любого положения палочкообразной частички одинакова в том смысле, что угол α , образуемый осью частички

с направлением потока, может иметь различные значения. При увеличении давления палочкообразные частицы могут ориентироваться по потоку, при этом уменьшается сопротивление потоку, следовательно, и вязкость раствора [10]. В концентрированных растворах длинные цепочкообразные молекулы могут переплетаться друг с другом и принимать разнообразные конфигурации, образовывать сетки, оказывающие очень сильное сопротивление потоку жидкости. При увеличивающемся давлении эти структуры постепенно разрушаются. Внутри сеток, образованных переплетением длинных цепей, может быть заключен растворитель. Образованию структур способствует явление ассоциации [11]. Повышение температуры, увеличивая подвижность частиц, всегда приводит к разрушению структур. Поэтому при повышении температуры наблюдаются меньшие отклонения от закона Ньютона. Однако следует иметь в виду, что повышение температуры часто приводит к деструкции цепей полимеров. Таким образом, более короткие цепи оказывают меньше сопротивление течению жидкости, следовательно, и вязкость раствора становится меньше [12, 13].

Целью настоящей работы было изучение вязкости раствора нафтифина гидрохлорида с комбинацией полиэтиленгликолей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения вязкости раствора нафтифина гидрохлорида для наружного применения, предназначенного для лечения грибковых заболеваний ногтей, в качестве лекарственного вещества (ЛВ) использовалась субстанция нафтифина гидрохлорида, который является искусственно полученным гомологом аллиламина. Нафтифин гидрохлорид обладает высокой противогрибковой активностью [14,15].



Химическое название, согласно номенклатуре ИЮПАК: (Е)-N-Метил-N-(3-фенил-2-пропенил)-1-нафталинметанамин.

Объектами исследований являлись: субстанция нафтифина гидрохлорида (Naftifini hydrochloridi) соответствует требованиям Фармакопеи США и по описанию представляет собой белый или беловатый мелкокристаллический порошок, растворимый в метиловом или этиловом спиртах, и практически не растворим в воде [16].

Подбор вспомогательных веществ, позволяющих сохранить стабильность и оптимальный терапевтический эффект нафтифина гидрохлорида в растворе, основывался на технологических свойствах субстанции. Использовались вспомогательные вещества такие, как пропиленгликоль, вода очищенная

(ГФ XIV, ФС.2.2.0020.18), спирт этиловый 95% (ГФ XIV, ФС.2.1.0036.15), полиэтиленгликоли (ПЭГ-400, ПЭГ-1000, ПЭГ-1500) [17, 18].

Пропиленгликоль (Propylene Glycol) – бесцветная вязкая жидкость со слабым запахом, сладковатым вкусом, обладающая гигроскопическими свойствами. Применяется как вспомогательное вещество. Его температура кипения – 187 °С, температура замерзания – 60 °С. Одним из важных свойств пропиленгликоля является его способность к растворению как гидрофильных, так и гидрофобных веществ, что позволяет смешивать с помощью него вещества, которые сами по себе не смешиваются [18]. Пропиленгликоль предоставлен компанией DOW EUROPE GMBH, серия F820GARPD2, срок годности 27/10/2019.

Использовались приборы весы лабораторные ВЛТЭ-150 (ГОСТ 24104-01) и вискозиметр капиллярный стеклянный ВПЖ-2 (ГОСТ 10028-81) 0,34 мм, магнитная мешалка с подогревом ММ-5

Все приборы соответствовали техническим характеристикам, прошли государственную проверку и разрешены к экспериментальным исследованиям.

В первую очередь определили растворимость нафтифина гидрохлорида. Для определения растворимости навеску нафтифина, вносили в отмеренное количество этилового спирта 95% и перемешивали, используя магнитную мешалку, до полного растворения при 25 °С. Препарат считали растворившимся, если в растворе при наблюдении невооруженным глазом не обнаруживались частицы лекарственного вещества [13].

Вискозиметрический метод – наиболее простой и доступный метод определения вязкости высокомолекулярных соединений. Данный метод основан на зависимости вязкости растворов полимера от его молекулярного веса. Этот метод опирается на закон Пуазейля о вязкой жидкости, описывающий закономерности движения жидкости в капилляре (рисунок 1).

Приведенное уравнение используют для определения динамической вязкости,

$$Q = \pi R^4 p / \eta L \Rightarrow \eta = \pi R^4 p / 8 Q L$$

где Q – количество жидкости, протекающей через капилляр капиллярного вискозиметра в единицу времени, м³/с; R – радиус капилляра вискозиметра, м; L – длина капилляра капиллярного вискозиметра, м; η – вязкость жидкости, Па·с; p – разность давлений на концах капилляра вискозиметра, Па.

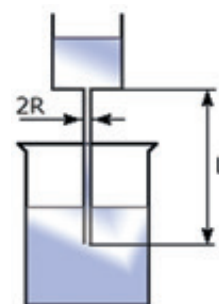


Рисунок 1. Схематическое изображение капиллярного вискозиметра

Figure 1. Schematic illustration of a capillary viscometer

Метод капиллярной вискозиметрии вполне можно отнести к высокоточному методу вискозиметрии в силу того, что относительная погрешность измерений составляет доли процента, в зависимости от подбора материалов вискозиметра и точности отсчёта времени, а также иных параметров, участвующих в методе капиллярного истечения [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании мы рассматриваем шесть прописей раствора нафтифина гидрохлорида, с различными комбинациями ПЭГ. В таблице 2 представлены результаты изучения вязкости представленных образцов растворов.

Как мы видим вязкость растворов с использованием полиэтиленгликоля в разы выше (прописи № 2–6). Время течения раствора в прописи № 1 без использования ПЭГ составляет 13:38, 25. Максимальное время раствора нафтифина в прописи № 5 с комбинацией ПЭГ-400:1500 в соотношении 7:3 составляет 4:25:31,72. Первая пропись, как образец, полностью соответствует составу препарата «Экзодерил» [3], при этом время течения раствора минимальное. Изменение состава прописей № 2–6 за счет введения полиэтиленгликоля максимально увеличивает время течения, что соответствует более высокой вязкости раствора.

Таблица 2. Исследуемые прописи раствора нафтифина гидрохлорида

Table 2. The studied prescriptions of the solution naftifine hydrochloride

Пропись 1	Время течения растворов
Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% Пропиленгликоль Вода	время течения раствора 13:38,25
Пропись 2 Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% ПЭГ-400 V ₁ ПЭГ-400 V ₂	время течения раствора 1:15:45,13
Пропись 3 Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% ПЭГ-400 (минимальный объем)	время течения раствора 1:00:40,91
Пропись 4 Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% ПЭГ-400 (максимальный объем)	время течения раствора 2:19:39,12
Пропись 5 Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% ПЭГ-400:1500 7:3 8:2 9:1	время течения раствора 4:25:31,72 время течения раствора 1:44:09,12 время течения раствора 1:46:21,80
Пропись 6 Нафтифин гидрохлорид Спирт этиловый 95% ПЭГ-400:1000 7:3 8:2 9:1	время течения раствора 2:16:31,05 время течения раствора 1:59:53,08 время течения раствора 1:44:28,26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного нами исследования по созданию пролонгированных антимикозных растворов нафтифина гидрохлорида получен наиболее перспективный состав комбинации нафтифина гидрохлорида и полиэтиленгликолей. Раствор с высокой вязкостью позволит уменьшить расход препарата и соблюсти точность дозирования (таблица 2). Введение полиэтиленгликоля способствует может способствовать снижению побочных действий в виде сухости, покраснения, раздражения за счет своих смягчающих свойств и обеспечить более комфортное применение раствора.

ЛИТЕРАТУРА

- Осовская И. И., Антонова В. С. Вязкость растворов полимеров: учебное пособие. Изд-е 2-е, доп. / ВШЭ СПбГУПТД. СПб., 2016: 62.
- Сергеев Ю. В., Шпигель Б. И., Сергеев А. Ю. Фармакотерапия микозов. М.: «Медицина для всех». С. 200.
- Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: БИНОМ-Пресс, 2003: 440.
- Сергеев Ю. В., Сергеев А. Ю., Мокина Е. В., Бучинский О. И. Горячая линия: Первая массовая кампания по выявлению и лечению больных с онихомикозом / Успехи клинической иммунологии и аллергологии / Под ред. А.В. Караулова. – М. 2002: 355–363.
- Сергеев Ю. В., Ларионова В. Н., Кудрявцева Е. В., Сергеева Е. Л. Кандид-Б и терапия дерматозов, ассоциированных с грибковой и смешанной инфекцией // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2003; 1: 94–98.
- Ryder N. S., Seidl G., Troke P. F. Effect of the antimycotic drug naftifine on growth of and sterol biosynthesis in *Candida albicans* // *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(4): 483–487.
- Favre B., Ryder N. S. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents // *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(2): 443–447.
- Ryder N. S. Effect of allylamine antimycotic agents on fungal sterol biosynthesis measured by sterol side-chain methylation // *J Gen Microbiol.* 1985; 131; 7: 1595–1602.
- Meingassner J. G., Sleytr U., Petranyi G. Morphological changes induced by Naftifine, a new antifungal agent, in *Trichophyton mentagrophytes* // *J Invest Dermatol.* 1981; 77(6): 444–451.
- Butty P., Mallie M., Bastide J. M. Antifungal activity of allylamines on *Epidermophyton floccosum*: scanning electron microscopy study // *Mycopathologia.* 1992; 120(3): 147–153.
- Butty P., Gorenflot A., Mallie M. et al. Low voltage scanning electron microscopy study of naftifine activity on *Microsporum canis* // *Mycoses.* 1992; 35(11-12): 335–342.
- Georgopoulos A., Petranyi G., Mieth H. et al. *In vitro* activity of naftifine, a new antifungal agent // *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(3): 386–389.
- Regli P., Ferrari H., Buffard Y. et al. *In vitro* action of a new antifungal agent, naftifine, on dermatophytes // *Pathol Biol (Paris).* 1985; 33(5); 2: 614–617.
- Macura A. B. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a comparison of two methods // *Int J Dermatol.* 1993; 32(7): 533–536.
- Venugopal P. V., Venugopal T. V. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines // *Int J Dermatol.* 1994; 33(10): 730–732.

16. Venugopal P. V., Venugopal T. V. Antidermatophytic activity of allylamine derivatives // *Indian J Pathol Microbiol.* 1994; 37(4): 381–388.
17. Venugopal P. V., Venugopal T. V. Antifungal activity of allylamine derivatives // *Indian J Med Res.* 1994; 99: 71–73.
18. Monk J. P., Brogden R. N. Naftifine. A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial dermatomycoses // *Drugs.* 1991; 42: 659–672.
19. Petranyi G., Georgopoulos A., Mieth H. *In vivo* antimycotic activity of naftifine // *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(3): 390–392.
20. Choi T. S., Solomon B., Nowakowski M., Lee W. L., Geen S. et al. Effect of naftifine on neutrophil adhesion // *Skin Pharmacol.* 1996; 9: 190–196.
21. Solomon B. A., Lee W. L., Geen S. C., Suntharalingam K., Fikrig S. M. et al. Modification of neutrophil functions by naftifine // *Br J Dermatol.* 1993; 128: 393–398.
22. Vago T., Baldi G., Colombo D. et al. Effects of naftifine and terbinafine, two allylamine antifungal drugs, on selected functions of human polymorphonuclear leukocytes // *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(11): 2605–2611.
23. Tronnier H. Inflammatory dermatomycoses – comparative study of naftifine and a combination of a corticosteroid and an imidazole derivative // *Mykosen.* 1987; 30; 1: 98–103.
24. Saeki S., Kuwahara N., Nakata M., Kaneko M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions // *Polymer.* 1976; 17: 685–689.
14. Macura A. B. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a comparison of two methods // *Int J Dermatol.* 1993; 32(7): 533–536.
15. Venugopal P. V., Venugopal T. V. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines // *Int J Dermatol.* 1994; 33(10): 730–732.
16. Venugopal P. V., Venugopal T. V. Antidermatophytic activity of allylamine derivatives // *Indian J Pathol Microbiol.* 1994; 37(4): 381–388.
17. Venugopal P. V., Venugopal T. V. Antifungal activity of allylamine derivatives // *Indian J Med Res.* 1994; 99: 71–73.
18. Monk J. P., Brogden R. N. Naftifine. A review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial dermatomycoses // *Drugs.* 1991; 42: 659–672.
19. Petranyi G., Georgopoulos A., Mieth H. *In vivo* antimycotic activity of naftifine // *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(3): 390–392.
20. Choi T. S., Solomon B., Nowakowski M., Lee W. L., Geen S. et al. Effect of naftifine on neutrophil adhesion // *Skin Pharmacol.* 1996; 9: 190–196.
21. Solomon B. A., Lee W. L., Geen S. C., Suntharalingam K., Fikrig S. M. et al. Modification of neutrophil functions by naftifine // *Br J Dermatol.* 1993; 128: 393–398.
22. Vago T., Baldi G., Colombo D. et al. Effects of naftifine and terbinafine, two allylamine antifungal drugs, on selected functions of human polymorphonuclear leukocytes // *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(11): 2605–2611.
23. Tronnier H. Inflammatory dermatomycoses – comparative study of naftifine and a combination of a corticosteroid and an imidazole derivative // *Mykosen.* 1987; 30; 1: 98–103.
24. Saeki S., Kuwahara N., Nakata M., Kaneko M. Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions // *Polymer.* 1976; 17: 685–689.

REFERENCES

1. Osovskaya I. I., Antonova V. S. The Viscosity of polymer solutions: study benefit. Ed. 2nd sup.] / *VSHTEH SPbGUPD.* SPb., 2016: 62 (In Russ.).
2. Sergeev Yu. V., Shpigel' B. I., Sergeev A. Yu. Pharmacotherapy of fungal infections. M.: «Medicina dlya vseh», P. 200. (In Russ.).
3. Sergeev A. Yu., Sergeev Yu. V. Fungal infection. Guide for doctors. – M.: BINOM-Press, 2003: 440 (In Russ.).
4. Sergeev Yu. V., Sergeev A. Yu., Mokina E. V., Buchinskij O. I. Hot line: the First mass campaign to detect and treat patients with onychomycosis / *Advances in clinical immunology and Allergology.* Ed. by A. V. Karaulov. – M. 2002: 355–363 (In Russ.).
5. Sergeev Yu. V., Larionova V. N., Kudryavceva E. V., Sergeeva E. L. Candid-B and therapy of dermatoses associated with fungal and mixed infection // *Immunopathology, Allergology, Infectology.* 2003; 1: 94–98. (In Russ.).
6. Ryder N. S., Seidl G., Troke P. F. Effect of the antimycotic drug naftifine on growth of and sterol biosynthesis in *Candida albicans* // *Antimicrob Agents Chemother.* 1984; 25(4): 483–487.
7. Favre B., Ryder N. S. Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents // *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(2): 443–447.
8. Ryder N. S. Effect of allylamine antimycotic agents on fungal sterol biosynthesis measured by sterol side-chain methylation // *J Gen Microbiol.* 1985; 131; 7: 1595–1602.
9. Meingassner J. G., Sleytr U., Petranyi G. Morphological changes induced by Naftifine, a new antifungal agent, in *Trichophyton mentagrophytes* // *J Invest Dermatol.* 1981; 77(6): 444–451.
10. Butty P., Mallie M., Bastide J. M. Antifungal activity of allylamines on *Epidermophyton floccosum*: scanning electron microscopy study // *Mycopathologia.* 1992; 120(3): 147–153.
11. Butty P., Gorenflot A., Mallie M. et al. Low voltage scanning electron microscopy study of naftifine activity on *Microsporum canis* // *Mycoses.* 1992; 35(11-12): 335–342.
12. Georgopoulos A., Petranyi G., Mieth H. et al. *In vitro* activity of naftifine, a new antifungal agent // *Antimicrob Agents Chemother.* 1981; 19(3): 386–389.
13. Regli P., Ferrari H., Buffard Y. et al. *In vitro* action of a new antifungal agent, naftifine, on dermatophytes // *Pathol Biol (Paris).* 1985; 33(5): 2: 614–617.

Серия тестеров растворения

ERWEKA DT light

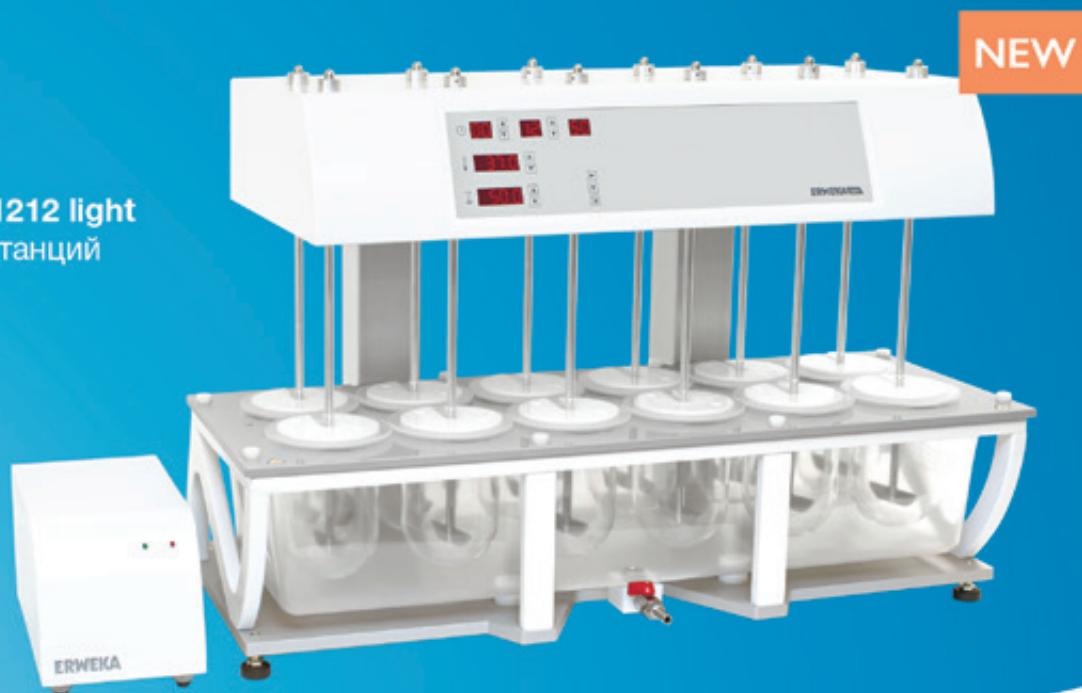
Экономичные тестеры с ручным отбором проб



DT 126 light
6 станций

DT 128 light
8 станций

DT 1212 light
12 станций



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-33-37
УДК 620.187.2; 615.453.8

Исследование морфологии сорбционных веществ

А. В. Бондарев^{1*}, Е. Т. Жиликова¹, Н. Б. Демина², В. Ю. Новиков¹

1 – ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), кафедра фармацевтической технологии, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра фармацевтической и биомедицинской технологии, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Бондарев А. В. E-mail: alexbond936@yandex.ru

Статья получена: 12.03.2019. Статья принята к печати: 13.03.2019

Резюме

Введение. Вещества с сорбционными свойствами возможно использовать для создания транспортных лекарственных систем, в которых основным механизмом связывания, транспорта и выделения лекарственной молекулы является сорбционный. Сорбент в данном случае выступает в качестве переносчика лекарственной молекулы с последующей ее доставкой к месту назначения посредством десорбции. Одним из путей изучения процессов сорбции-десорбции в транспортных лекарственных системах является исследование морфологии сорбционного вещества. Поэтому актуальным является морфологический анализ сорбционных веществ, включающий в себя размер, форму и пространственную организацию структурных элементов.

Цель. Изучение морфологии сорбционных веществ.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования использовали уголь активный, кремния диоксид, повидон, смектит диоктаэдрический, каолин, монтмориллонитовую глину. Методы – растровая электронная микроскопия.

Результаты и обсуждение. Проведена растровая электронная микроскопия объектов с применением сегментирования элементов как подсистем, внутри которых морфологическое описание не проникает. Установлено, что для угля активного и кремния диоксида сегментирование элементов представлено тремя уровнями организации, для повидона, смектита, каолина и монтмориллонитовой глины сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации. Исследована морфология объектов. Установлено, что исследуемые вещества являются микроструктурными объектами. Определена пористость в образцах угля активного, смектита диоктаэдрического, каолина, монтмориллонитовой глины. В образцах кремния диоксида и повидона пористость отсутствует.

Заключение. Морфологический анализ сорбционных веществ позволил разработать классификацию возможного взаимодействия вещества-носителя с лекарственной молекулой в транспортной лекарственной системе. Исследуемые материалы по пористым характеристикам делятся на две группы: 1 группа – пористые вещества – сорбционное взаимодействие в порах (уголь активный), сорбционное взаимодействие в порах и посредством ионнообмена (смектит, монтмориллонитовая глина), сорбция во вторичных порах и посредством кислородных и гидроксильных центров (каолин); 2 группа – не пористые вещества – сорбция на кислородных центрах (кремния диоксид), сорбция посредством комплексообразования (повидон). Перспективой дальнейшего исследования является моделирование пористости и сорбционного взаимодействия вещества-носителя с лекарственной молекулой в транспортной лекарственной системе.

Ключевые слова: морфология, сорбент, электронная микроскопия, микрофотография, сегмент, пористость.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Бондарев А. В., Жиликова Е. Т., Демина Н. Б., Новиков В. Ю. Исследование морфологии сорбционных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 33–37.

Study of Morphology of Sorption Substances

A. V. Bondarev^{1*}, E. T. Zhilyakova¹, N. B. Demina², V. Y. Novikov¹

1 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State University», Department of pharmaceutical technology, 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia

2 – I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Department of pharmaceutical and biomedical technology, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: A. V. Bondarev. E-mail: alexbond936@yandex.ru

Received: 12.03.2019. Accepted: 13.03.2019

Abstract

Introduction. Substances with sorption properties can be used to create transport drug systems, in which the main mechanism of binding, transport and release of the drug molecule is sorption. The sorbent in this case acts as a carrier of the drug molecule, followed by its delivery to the destination by desorption. One of the ways to study the processes of sorption-desorption in transport drug systems is the study of the morphology of the sorption substance. Therefore, the morphological analysis of sorption substances is important, including the size, shape, and spatial organization of their structural elements.

Aim. The study of the morphology of sorption substances.

Materials and methods. The materials of the study are active coal, silicon dioxide, povidone, dioctahedral smectite, kaolin and montmorillonite clay. The methods is scanning electron microscopy.

Results and discussion. The scanning electron microscopy of objects was carried out using segmentation of elements as subsystems, inside of which the morphological description does not penetrate. It was established that for coal of active and silicon dioxide, the segmentation of elements is represented by three levels of organization; for povidone, smectite, kaolin and montmorillonite clay, the segmentation of elements is represented by two levels of organization. The morphology of the objects was investigated. It is established that the studied substances are microstructural objects. Porosity in samples of active coal, smectite dioctahedral, kaolin, montmorillonite clay was determined. In samples of silicon dioxide and povidone porosity is absent.

Conclusion. Morphological analysis of sorption substances allowed us to develop classification of the possible interaction of the carrier substance with the drug molecule in the transport drug system. The materials under study are divided into two groups according to porous characteristics: group 1 – porous substances – sorption interaction in pores (active coal), sorption interaction in pores and by ion exchange (smectite, montmorillonite clay), sorption in secondary pores and through oxygen and hydroxyl centers (kaolin); group 2 – non-porous substances – sorption on oxygen centers (silicon dioxide), sorption by means of complex formation (povidone). The prospect of further research is the modeling of porosity and sorption interaction of the carrier substance with the drug molecule in the drug transport system.

Keywords: morphology, sorbent, electron microscopy, micrograph, segment, porosity.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Bondarev A. V., Zhilyakova E. T., Demina N. B., Novikov V. Y. Study of morphology of sorption substances. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 33–37.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время сорбционные материалы находят широкое применение в медицине и фармации. Вещества с сорбционными свойствами возможно использовать для создания транспортных лекарственных систем, в которых основным механизмом связывания, транспорта и выделения лекарственной молекулы является сорбционный. Сорбент в данном случае выступает в качестве переносчика лекарственной молекулы с последующей ее доставкой к месту назначения посредством десорбции.

Одним из путей изучения процессов сорбции-десорбции в транспортных лекарственных системах является исследование морфологической микроструктуры сорбционного вещества. Под морфологической микроструктурой понимается совокупная характеристика элементов, включающая в себя их размер, форму и пространственную организацию [1]. Морфология элементов может существенным образом различаться в зависимости от состава материала, его кристаллической структуры и способа получения. Зная физико-химические свойства вещества, в частности морфологию поверхности, можно прогнозировать сорбционные характеристики [2]. Изменение морфологии поверхности является действенным способом управления функциональными характеристиками сорбционных веществ.

Цель работы – исследование морфологии сорбционных веществ.

Задачи исследования:

1. Провести электронную микроскопию и исследование морфологии объектов.
2. Разработать классификацию сорбционного взаимодействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали следующие материалы: уголь активный (осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-А, ГОСТ 4453-74, Россия), кремния диоксид (P N001140/01, Россия), повидон (поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский с молекулярной массой 12600 ± 2700 , N ЛС-001913, Россия), смектит диоктаэдрический (РУ ПН 015155/01, Франция), каолин (ГОСТ 19608-84, Россия), монтмориллонитовая глина (ТУ 9296-001-62646221-2012, Россия).

Для исследования морфологии использовали растровую электронную микроскопию (РЭМ). Микроскопы FEI Quanta 600, FEG Quanta 200 3D с режимом низкого вакуума – детектором LFD. РЭМ использует принцип развертки тонкого пучка электронов по поверхности образца. Каждая точка образца последовательно облучается сфокусированным электронным пучком, который перемещается по исследуемой поверхности, в результате возникают ответные сигналы различной физической природы (отраженные и вторичные электроны, Оже-электроны, рентгеновское излучение), которые используются для синхронного построения изображения. РЭМ проведена на базе

ЦКП «Технологии и материалы» НИУ «БелГУ». При описании морфологии объектов использовали методики, представленные в [3–4].

РУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены микрофотографии угля активного.

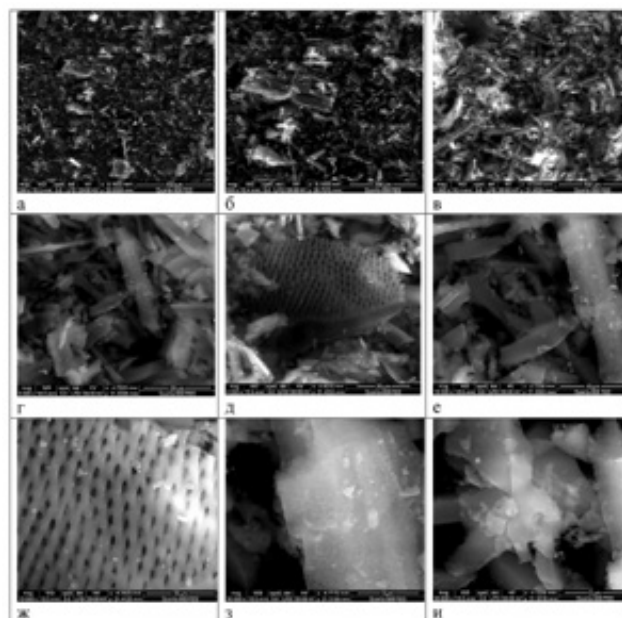


Рисунок 1. Микрофотографии угля активного. Масштабный отрезок:

а – 400 мкм; б – 200 мкм; в – 100 мкм; г, ж – 20 мкм; д, з – 10 мкм; е, и – 3 мкм

Figure 1. Micrographs of active coal. Scale length: а – 400 μm ; б – 200 μm ; в – 100 μm ; г, ж – 20 μm ; д, з – 10 μm ; е, и – 3 μm

Для проведения анализа применили метрику, представленную в правом нижнем углу каждой микрофотографии, а также сегментирование элементов как подсистем, внутрь которых описание не проникает. Сегментирование элементов угля активного представлено тремя уровнями: 1 уровень – это микрофотографии а-в, 2 уровень – г-д, третий уровень – е-и.

Как следует из рис. 1, на первом уровне организации микроструктуры при увеличении в 280–1000 раз основным элементом морфологии являются частицы игольчатой формы размером 100 мкм и менее. Встречаются агломераты, состоящие из соединенных между собой частиц игольчатой формы размером более 100 мкм. Второй уровень при увеличении в 5000–10000 раз представлен элементами в виде объемных пластин размером 20 мкм. Объемные пластины имеют шероховатый вид за счет цилиндрических пор, которые отчетливо проявляются на третьем уровне организации при увеличении в 10000–30000 раз. Цилиндрические поры имеют размер 0,5–1 мкм. Шероховатость каждого элемента говорит о их пористости. Таким образом, уголь активный является пористым веществом.

На рисунке 2 представлены микрофотографии кремния диоксида. Сегментирование элементов представлено тремя уровнями организации: 1 уровень – это микрофотографии а-в, второй уровень – г, третий уровень – д-е.

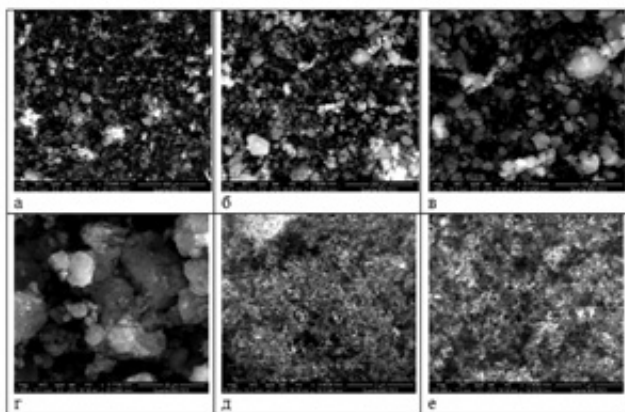


Рисунок 2. Микрофотографии кремния диоксида. Масштабный отрезок:
а – 400 мкм, б – 200 мкм, в – 100 мкм, г – 20 мкм, д – 2 мкм, е – 1 мкм

Figure 2. Micrographs of silicon dioxide. Scale length:
а – 400 μm, б – 200 μm, в – 100 μm, г – 20 μm, д – 2 μm, е – 1 μm

На первом уровне организации структуры кремния диоксида при увеличении в 250–1000 раз основным элементом морфологии являются частицы округлой формы размером 3–30 мкм. Второй уровень при увеличении в 5000 раз представлен элементами в виде частиц округлой формы с шероховатой поверхностью. Шероховатость поверхности частиц говорит о наноструктурных отдельных элементах, представленных на третьем уровне организации. Наноструктурные элементы имеют размер 20,4–64,1 нм. Пористость отсутствует.

На рисунке 3 представлены микрофотографии повидона. Сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации: 1 уровень – это микрофотографии а-в, второй уровень – г.

На первом уровне организации структуры повидона при увеличении в 250–1000 раз основным элементом морфологии являются частицы округлой формы размером 30–100 мкм. Характерной особенностью округлых частиц является наличие углублений в виде «окон», позволяющих при дальнейшем масштабировании рассмотреть внутреннее строение, характерное для второго уровня организации частиц повидона. Второй уровень при увеличении в 3000 раз представлен элементами в виде частиц округлой формы – глобул размером 5–10 мкм. Предположительно глобулы являются скрученными полимерными цепями. Пористость отсутствует.

Ранее нами были проведены морфологические исследования минеральных сорбентов с помощью микроскопа Quanta 200 3D. Полученные микрофотографии смектита представлены на рисунке 4.

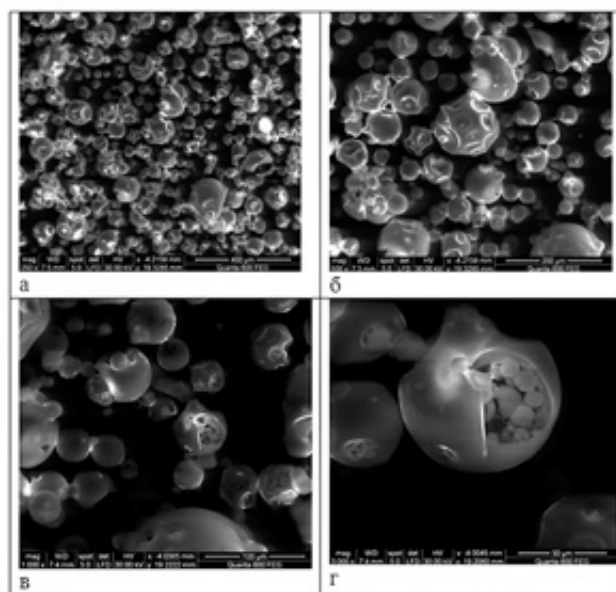


Рисунок 3. Микрофотографии повидона. Масштабный отрезок:
а – 400 мкм; б – 200 мкм; в – 100 мкм; г – 30 мкм

Figure 3. Micrographs of povidone. Scale length:
а – 400 μm; б – 200 μm; в – 100 μm; г – 30 μm

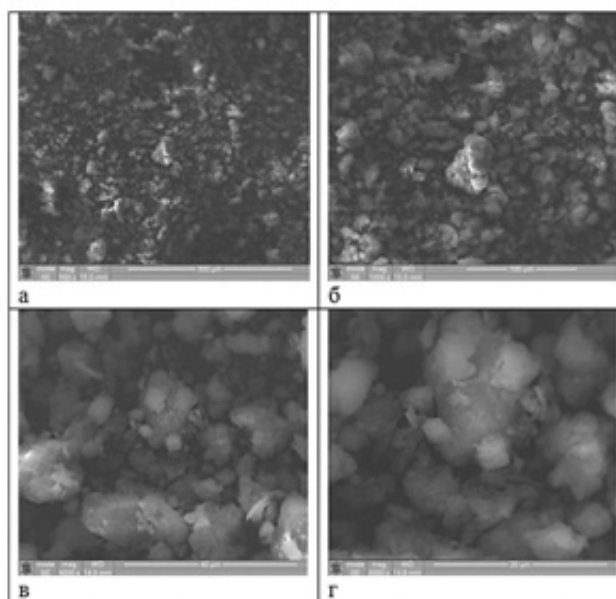


Рисунок 4. Микрофотографии смектита. Масштабный отрезок:
а – 300 мкм; б – 100 мкм; в – 40 мкм; г – 20 мкм

Figure 4. Micrographs of smectite. Scale length:
а – 300 μm; б – 100 μm; в – 40 μm; г – 20 μm

Сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации: 1 уровень – это микрофотографии а-б, второй уровень – в-г.

Как видно на рисунке 4, смектит на первом уровне организации представляет собой скопления круглых, овальных, пластинчатых частиц. Средний размер частиц составил 5–20 мкм. Второй уровень при увеличении в 4–8 тысяч раз представлен пластинчаты-

ми элементами, объединенными между собой в частицы округлой формы – глобулы размером 1–20 мкм. Наблюдаются поры, образованные соединением пластинчатых элементов между собой.

На рисунке 5 представлены микрофотографии каолина. Сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации: 1 уровень – это микрофотографии а-б, второй уровень – в-г.

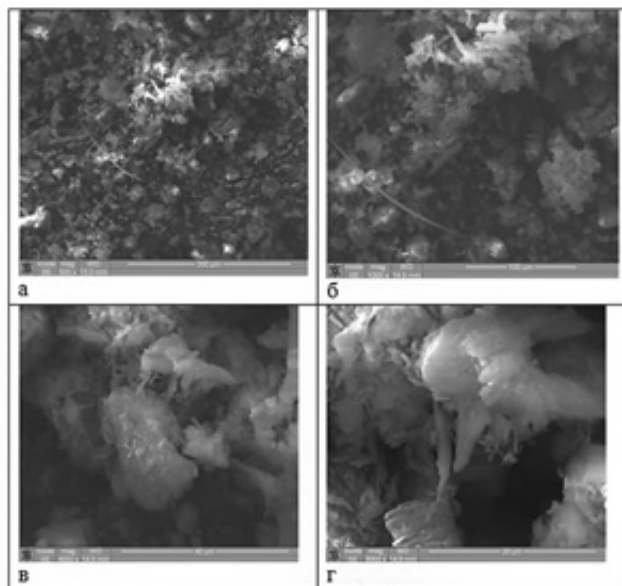


Рисунок 5. Микрофотографии каолина. Масштабный отрезок: а – 300 мкм; б – 100 мкм; в – 40 мкм; г – 20 мкм

Figure 5. Micrographs of kaolin. Scale length: а – 300 μm ; б – 100 μm ; в – 40 μm ; г – 20 μm

На первом уровне организации каолин состоит из частиц неправильной формы размером 5–20 мкм, встречаются элементы размером до 50 мкм. Второй уровень при увеличении в 4–8 тысяч раз представлен элементами, объединенными между собой в частицы неправильной формы размером 1–20 мкм с развитой шероховатой поверхностью. Имеются поры, образованные соединением пластинчатых элементов между собой.

На рисунке 6 представлены микрофотографии монтмориллонитовой глины. Сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации: 1 уровень – это микрофотографии а-б, второй уровень – в-г.

Монтмориллонитовая глина, представленная на рисунке 6, на первом уровне организации состоит из равноосных частиц пластинчатой формы с неровной поверхностью, острыми краями, трещинами; средний размер частиц составил 2–5 мкм. Встречаются агрегаты с хлопьевидными очертаниями, складчатые образования. На втором уровне организации при увеличении в 4–8 тысяч раз пластинчатые частицы объединены в более крупные элементы. Имеются поры различных размеров, образованные соединением пластинчатых элементов между собой.

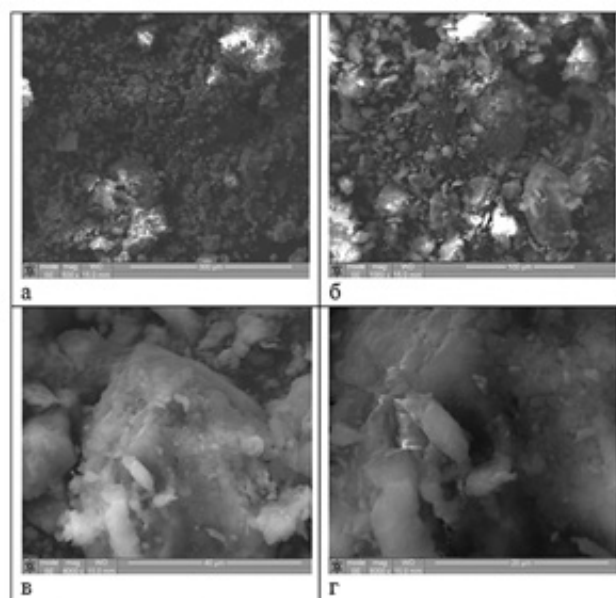


Рисунок 6. Микрофотографии монтмориллонитовой глины. Масштабный отрезок:

а – 300 мкм; б – 100 мкм; в – 40 мкм; г – 20 мкм

Figure 6. Micrographs of montmorillonite clay. Scale length: а – 300 μm ; б – 100 μm ; в – 40 μm ; г – 20 μm

В настоящее время в России исследования по разработке лекарственных форм второго поколения – транспортных лекарственных систем, в которых основным механизмом транспорта является процесс сорбции, не проводились. Морфологический анализ сорбционных веществ позволил разработать классификацию возможного взаимодействия вещества-носителя с лекарственной молекулой в транспортной лекарственной системе. Сорбционные характеристики исследуемых объектов взяты из предыдущих работ автора [5–6]. Полученные данные представлены в таблице 1.

Согласно представленной классификации, исследуемые материалы по пористым характеристикам делятся на две группы:

1 группа – сорбционное взаимодействие в порах (уголь активный), сорбционное взаимодействие в порах и посредством ионнообмена (смектит, монтмориллонитовая глина), сорбция во вторичных порах и посредством кислородных и гидроксильных центров (каолин);

2 группа – сорбция на кислородных центрах (кремния диоксид), сорбция посредством комплексообразования (повидон).

Перспектива дальнейшего исследования является моделирование пористости и сорбционного взаимодействия вещества-носителя с лекарственной молекулой в транспортной лекарственной системе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена электронная микроскопия объектов с применением сегментирования элементов как подсистем, внутри которых морфологическое опи-

Таблица 1. Данные сорбционных характеристик исследуемых объектов

Table 1. Sorption characteristics data objects under study

№	Наименование объекта	Наличие пор	Сорбционные характеристики
1 группа – пористые вещества			
1	Уголь активный	Первичные и вторичные поры	Уголь активный представляет собой пористый материал, состоящий из кристаллитов графита и аморфного углерода с активными кислородными центрами. Имеет сильно развитую общую пористость, широкий диапазон пор и значительную величину удельной поверхности
2	Смектит	Первичные и вторичные поры	Смектит представляет собой полимерную кремнеорганическую основу, содержащих в качестве гетероатомов алюминий и магний с координированными вокруг себя ОН-группами. Обладает ионнообменной способностью
3	Каолин	Вторичные поры	Каолин представляет собой полимерную кремнеорганическую основу, содержащих кислород, гидроксильные группы, которые могут формировать сорбционные центры
4	Монтмориллонитовая глина	Первичные и вторичные поры	Монтмориллонитовая глина представляет собой полимерную кремнеорганическую основу, содержащую в качестве гетероатомов алюминий и магний, с координированными вокруг себя ОН-группами. Благодаря наличию двойного электрического слоя, монтмориллонитовая глина обладает ионнообменной способностью
2 группа – не пористые вещества			
5	Кремния диоксид	Отсутствуют	Кремния диоксид представляет собой высокодисперсионный порошок. Механизм сорбции основан на высокой удельной поверхности вещества с активными центрами
6	Повидон	Отсутствуют	Низкомолекулярный поливинилпирролидон представляет собой полимер с молекулярной массой $12\,600 \pm 2700$ или 8000 ± 2000 . В основе сорбционных свойств повидона лежит способность к комплексообразованию

сание не проникает. Установлено, что для угля активного и кремния диоксида сегментирование элементов представлено тремя уровнями организации, для повидона, смектита, каолина и монтмориллонитовой глины сегментирование элементов представлено двумя уровнями организации. Изучена морфология объектов. Установлено, что исследуемые вещества являются микроструктурными объектами. Определена пористость в образцах угля активного, смектита диоктаэдрического, каолина, монтмориллонитовой глины. В образцах кремния диоксида и повидон пористость отсутствует.

- Разработана классификация сорбционного взаимодействия. Согласно представленной классификации, исследуемые материалы по пористым характеристикам делятся на две группы:

1 группа – пористые вещества – сорбционное взаимодействие в порах (уголь активный), сорбционное взаимодействие в порах и посредством ионнообмена (смектит, монтмориллонитовая глина), сорбция во вторичных порах и посредством кислородных и гидроксильных центров (каолин);

2 группа – не пористые вещества – сорбция на кислородных центрах (кремния диоксид), сорбция посредством комплексообразования (повидон).

ЛИТЕРАТУРА

- Новик Е. С., Доренская А. В., Борисова Н. А., Гунар О. В. Оценка размера и формы частиц фармацевтических субстанций микроскопическим методом. *Успехи современного естествознания*. 2016; 11-2: 249–255.

- Высокоэффективные технологии измерения формы и размера частиц при разработке и обеспечении качества твердых лекарственных форм. *Фармацевтическая отрасль*. 2013; 3(38): 96–100.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1. ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия». Available at: <http://femb.ru/feml>.
- Емшанова С. В., Абрамович Р. А., Потанина О. Г. Влияние формы и размера частиц субстанций на качество готовых лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014; 2(7): 50–63.
- Жилякова Е. Т., Новиков О. О., Бондарев А. В., Фролов Г. В. Определение технологических и адсорбционных показателей медицинских глин. *Научные ведомости БелГУ*. 2013; 18(161): 229–234.
- Zhilyakova E. T., Bondarev A. V., Bojko N. N., Naplekov D. K. Physical research of porosity of mineral sorbents. *Journal of International Pharmaceutical Research*. 2018; 45: 477–480.

REFERENCES

- Novik E. S., Dorenska A. V., Borisova N. A., Gunar O. V. Estimation of the size and shape of particles of pharmaceutical substances by a microscopic method. *Successes of Modern Science*. 2016; 11-2: 249–255 (In Russ.).
- High-performance technologies for measuring the shape and size of particles in the development and quality assurance of solid dosage forms. *Pharmaceutical Industry*. 2013; 3(38): 96–100 (In Russ.).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. T. 1. OFS.1.2.1.0009.15 «Optical microscopy». Available at: <http://femb.ru/feml> (In Russ.).
- Emshanova S. V., Abramovich R. A., Potanina O. G. The influence of the shape and size of the particles of substances on the quality of finished medicines. *Drug Development & Registration*. 2014; 7: 45–63 (In Russ.).
- Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Bondarev A. V., Frolov G. V. Determination of technological and adsorption parameters of medical clays. *Scientific Bulletins of Belgorod State University*. 2013; 18(161): 229–234 (In Russ.).
- Zhilyakova E. T., Bondarev A. V., Bojko N. N., Naplekov D. K. Physical research of porosity of mineral sorbents. *Journal of International Pharmaceutical Research*. 2018; 45: 477–480.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-38-47
УДК 615.28

Нитрофураны для наружного применения (обзор)

А. В. Беляцкая¹, И. М. Кашликова^{1*}, А. О. Елагина¹, И. И. Краснюк (мл.)¹, И. И. Краснюк¹,
О. И. Степанова¹

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

*Контактное лицо: Кашликова Ирина М. E-mail: irina.kashlikova@mail.ru

Статья получена: 14.02.2019. Статья принята к печати: 25.03.2019

Резюме

Введение. В статье рассмотрены аспекты использования нитрофуранов для наружного применения (нитрофурала, фуразолидона и фуразидина). Проведен обзор современных исследований, посвященных разработке различных лекарственных средств, содержащих производные нитрофурана. Рассмотрены перспективы создания лекарственных форм фурацилина и фуразолидона, содержащих их твердые дисперсии с полимерами.

Текст. Группа нитрофуранов широко востребована на современном фармацевтическом рынке. Наиболее распространенные действующие вещества – фурацилин, фуразолидон и фуразидин представлены различными лекарственными формами как для внутреннего, так и для наружного применения. Все производные нитрофуранов имеют широкий спектр антимикробного действия и специфический механизм воздействия на бактериальные клетки. Низкий уровень развития устойчивости у микроорганизмов позволяет нитрофуранам уже многие десятилетия оставаться одной из эффективных химиотерапевтических групп антимикробных соединений. В обзоре рассмотрено большое количество современных разработок как российских, так и зарубежных авторов, посвященных использованию фурацилина, фурадонина и фуразидина для разработки состава новых лекарственных средств, в том числе комбинированных лекарственных препаратов, а также перспективных методов лечения. В настоящее время на базе Сеченовского университета активно ведутся исследования по повышению растворимости и скорости растворения нитрофуранов в воде с использованием метода твердых дисперсий. Также ведутся работы по разработке состава и технологии твердых (быстрорастворимых) ЛФ – гранул и таблеток, и мягких ЛФ – гелей, содержащих в качестве действующих веществ – фурацилин и фуразолидон.

Заключение. Несмотря на использование действующих веществ из группы нитрофурана в фармацевтической практике уже более полувека и их низкую растворимость в воде, исследования, посвященные разработке комплексных лекарственных средств для наружного применения и моно-препаратов нитрофуранов не утратили актуальности и активно ведутся по сей день.

Ключевые слова: нитрофураны, нитрофурал, фурацилин, фуразолидон, фуразидин, фурагин, твердые дисперсии.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Беляцкая А. В., Кашликова И. М., Елагина А. О., Краснюк (мл.) И. И., Краснюк И. И., Степанова О. И. Нитрофураны для наружного применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 38–47.

Nitrofurans for External Use (Review)

A. V. Beliatskaya¹, I. M. Kashlikova¹, A. O. Elagina¹, I. I. Krasnyuk (jr.)¹, I. I. Krasnyuk¹, O. I. Stepanova¹

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

*Corresponding author: Irina M. Kashlikova. E-mail: irina.kashlikova@mail.ru

Received: 14.02.2019. Accepted: 25.03.2019

Abstract

Introduction. Aspects of the use of nitrofurans for external use (nitrofurazone, furazolidone and furazidin) are described in the article. Review of current research that is dedicated to development of drugs containing nitrofuran derivatives has been carried out. The prospects for creating dosage forms of furacillin and furazolidone containing their solid dispersions with polymers are considered.

Text. The group of nitrofurans is widely in demand in the modern pharmaceutical market. The most common active ingredients – furacillin, furazolidone and furazidin are represented by various dosage forms for both internal and external use. All nitrofuran derivatives have a wide spectrum of antimicrobial action and a specific mechanism of action on bacterial cells. The low level of development of antimicrobial resistance allows nitrofurans to remain one of the most effective chemotherapeutic groups of antimicrobial compounds for many decades. The review shows a numerous current developments carried out by both Russian and foreign authors about use of furacillin, furadonin and furazidin to develop the composition of new drugs, including combination drugs, as well as promising treatment methods. Currently, on the basis of Sechenov University, research is actively conducted to increase the solubility and dissolution rate of nitrofurans in water using the method of solid dispersions. Also, work is underway to develop the composition and technology of solid (instant) dosage forms granules and tablets, and soft dosage forms gels containing furacillin and furazolidone as active substances.

Conclusion. Despite the use of active substances from the nitrofuran group in pharmaceutical practice for more than half a century and their low solubility in water, research on the development of complex drugs for external use and mono-preparations of nitrofurans have not lost their relevance and are actively conducted to this day.

Keywords: nitrofurans, nitrofurazone, furacillin, furazolidone, furazidin, furagin, solid dispersion.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Beliatskaya A. V., Kashlikova I. M., Elagina A. O., Krasnyuk (jr.) I. I., Krasnyuk I. I., Stepanova O. I. Nitrofurans for external use. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 38–47.

ВВЕДЕНИЕ

Препараты нитрофуранов – известные более 70 лет классические синтетические химиотерапевтические средства с широким антимикробным спектром действия. История клинического применения нитрофуранов или производных 5-нитрофурана начинается с 1943–1947 гг. после открытия M. Dodd и W. Stilman лечебного эффекта фурацилина, полученного в Англии при утилизации фурфурола [1]. Приоритет разработки оригинальных препаратов данного класса во многом принадлежит советским ученым, проводившим исследования в Институте органического синтеза АН Латвийской ССР с 1943 г. вплоть до конца 1980-х годов, под руководством академика С. А. Гиллера. Первыми лекарственными препаратами (ЛП) группы нитрофуранов стали фурадонин (нитрофурантоин), синтезированный в США в 1952 г. и фурагин (фуразидин), синтезированный в Латвии в 1954 году [2]. Из многочисленных синтезированных в 50-е гг. XX века в Институте органического синтеза АН Латвии производных нитрофурана в качестве химиотерапевтических средств наиболее широко на данный момент применяются: фурацилин (нитрофурал), фурадонин (нитрофурантоин), фуразолидон и фурагин (фуразидин) [3].

Нитрофураны были получены из 2 замещенного фурана присоединением к нему нитрогруппы в пятом положении. По химическому строению они относятся к 5-нитро-2-фурфулиденгидрозомам или 5-нитро-2-фурил (β-акрилен) гидрозомам [3, 4]. В зависимости от химического строения отдельные соединения этого ряда несколько различаются по спектру действия [4].

На сегодняшний день, несмотря на длительное применение производных нитрофурана в медицинской (с 1950-х) и ветеринарной практике (с 1994 г), данный класс веществ представлен ЛП как для внутреннего, так и наружного применения (таблица 1) [4, 5], а также выступает объектом большого количества новых исследований [1, 3, 6–44], что обусловлено широким спектром антимикробной активности соединений и специфическим механизмом действия.

Таблица 1. Способ применения производных нитрофурана, зарегистрированных в РФ

Table 1. Method of administration of nitrofurant derivatives registered in the Russian Federation

Для внутреннего применения	Для наружного применения
Фурадонин (нитрофурантоин) Эрсефурил (нифуроксазид)	Фурацилин (нитрофурал)
Для внутреннего и наружного применения	
Фуразолидон, Фурагин (фуразидин)	

Синтетические химиотерапевтические ЛП – производные нитрофурана – активны в отношении многих бактерий, устойчивых к антимикробным препаратам других классов химических веществ. Штаммы, резистентные к бета-лактамам, аминогликозидам, хло-

рамфениколу, фторхинолонам, тетрациклинам, сульфаниламидам, остаются чувствительными к нитрофуранам [45, 46].

Лекарственная устойчивость микроорганизмов к нитрофурановым соединениям связана со специфичностью механизма действия последних. Его связывают с несколькими факторами. Во-первых, являясь акцепторами электронов у кислорода и влияя на активность ферментов цепи переноса электронов, нитрофураны нарушают процесс клеточного дыхания бактерий и ингибируют цикл трикарбоновых кислот. Во-вторых, микробные флавопротеины восстанавливают 5-нитрогруппу нитрофуранов, при этом образующиеся высокореактивные аминопроизводные изменяют конформацию белков, в том числе рибосомальных, и других макромолекул, вызывая нарушение синтеза ДНК и РНК, и, в конечном счете, гибель бактериальных клеток. При приеме внутрь, в результате действия нитрофуранов микроорганизмы выделяют меньше токсинов, в связи с чем улучшение общего состояния пациента возможно еще до выраженного подавления роста микрофлоры. При этом действуют нитрофураны направленно в отношении микробной клетки, не влияя на клетки организма человека [5, 47, 48].

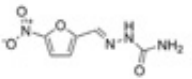
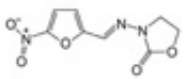

Из-за специфичности механизма действия устойчивость к нитрофуранам у микроорганизмов развивается медленно и не достигает высокой степени [5].

Таким образом, нитрофураны для приема внутрь и для наружного применения являются немногочисленной, но перспективной группой антибактериальных препаратов, с учетом возрастающего уровня резистентности многих штаммов бактерий. Особый интерес в разработке новых ЛП представляют нитрофураны для наружного применения – фурацилин, фуразолидон и фуразидин (таблица 2) из-за практически полного отсутствия как системных, так и местных побочных эффектов [5].

Высокая специфичность механизма действия, широкий спектр антимикробной активности и низкая резистентность микроорганизмов к действию нитрофуранов обуславливает обширный перечень показаний к их применению. За счет различий в химической структуре спектр активности нитрофуранов для наружного применения несколько различается (таблица 3), также присутствуют и отличия в механизме действия. Помимо всех эффектов, характерных для группы нитрофуранов, фурацилин увеличивает поглотительную способность ретикулоэндотелиальной системы, усиливает фагоцитоз [48]. Фуразолидон угнетает биохимические процессы микроорганизмов, в результате чего происходит разрушение их оболочки или цитоплазматической мембраны. Помимо этого, препарат стимулирует иммунитет: повышает фагоцитарную активность лейкоцитов и титра комплемента, ингибирует МАО [5, 47].

Таблица 2. Свойства нитрофуранов для наружного применения

Table 2. Properties of nitrofurans for external use

Действующее вещество (ДВ)	Физико-химические свойства
<p>Фурацилин (Нитрофурал)</p>  <p>2-[[5-Нитро-2-фуранил]метилени] гидразинкарбоксамид</p>	<p>Желтый или зеленовато-желтый мелкокристаллический порошок без запаха, горького вкуса, $T_{пл}$ = 230–236 °С. Очень мало растворим в воде (1:4200), мало растворим в спирте (1:1500), практически нерастворим в эфире, растворим в щелочах [49, 50].</p>
<p>Фуразолидон (Фуразолидон)</p>  <p>3-(5-нитро-2-фуранил) метилени-амино-2-оксазолидинон</p>	<p>Желтый или желтый с зеленоватым оттенком мелкокристаллический порошок, без запаха, не гигроскопичен; мало растворим в диметилформамиде, очень мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в воде и спирте 96%. $T_{пл}$ = 253–258 °С (с разложением) [49, 51].</p>
<p>Фурагин (Фуразидин)</p>  <p>1-[[3-(5-Нитро-2-фуранил)-2-пропенилиден]амино]-2,4-имидазолидиндион</p>	<p>Желтый или оранжево-желтый мелкокристаллический порошок без запаха, горький на вкус. Очень мало растворим в воде и этаноле, трудно растворим в диметилформамиде, мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в хлороформе и бензоле [5, 47].</p>

Фурацилин применяется наружно, в виде промышленно произведенных растворов: водного 0,02% (1:5000) или 0,066% (1:1500) спиртового (70% этанол). При гнойных ранах, пролежнях, язвах, ожогах, для

подготовки гранулирующей поверхности к пересадкам кожи и к наложению вторичного шва орошают рану водным раствором нитрофурала и накладывают влажные повязки. При остеомиелите после операции промывают полость водным раствором нитрофурала и накладывают влажную повязку. При эмпиеме плевры отсасывают гной и промывают плевральную полость с последующим введением в полость 20–100 мл водного раствора нитрофурала. Также возможно приготовление водных растворов нитрофурала с концентрацией 0,02% в домашних условиях путем растворения таблеток при кипячении, или путем растворения шипучих (быстрорастворимых) таблеток. Фурацилиновую мазь применяют наружно, накладывая тонкий слой мази на поврежденные участки кожи 2–3 раза в сутки [5, 47].

Наружно фуразолидон применяется в виде растворов, получаемых путем растворения таблеток при нагревании в воде. Таблетки фуразолидона 50 мг назначают внутрь, после еды. При лечении паратифа, дизентерии, пищевых токсикоинфекций взрослым – по 100–150 мг 4 раза в сутки на протяжении 5–10 дней, либо циклами по 3–6 дней (интервалы – 3–4 дня). При лечении лямблиоза взрослым – по 100 мг 4 раза в день, детям от 3 лет – в дозе 10 мг/кг массы тела в сутки (на 3–4 приема). ЛП не рекомендуется назначать более 10 дней. Для взрослых: высшая разовая доза – 200 мг, суточная – 800 мг. Лекарственные формы (ЛФ) для перорального приема должны проглатываться целиком во время или после еды, их необходимо запивать водой (объем жидкости должен быть не менее 100 мл) [4, 5, 47, 53].

Таблица 3. Спектры антибактериальной активности нитрофуранов для наружного применения

Table 3. Spectra of antibacterial activity nitrofurans for external use

ДВ	Спектр активности	Показания к применению
Фурацилин	Грамположительная и грамотрицательная флора, в том числе <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp. Подавляет жизнедеятельность грибковой флоры [4, 5, 47, 53].	Для наружного применения: лечение и предупреждение гнойно-воспалительных процессов, в том числе гнойные раны, пролежни, ожоги II-III степени, блефарит, конъюнктивит, фурункул наружного слухового прохода; остеомиелит, эмпиема околоносовых пазух, плевры (промывание полостей); острый наружный и средний отит, ангина, стоматит, гингивит; мелкие повреждения кожи (в том числе ссадины, царапины, трещины, порезы) [2, 4, 5, 45–47, 53].
Фуразолидон	Грамположительные кокки (<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.), грамотрицательные палочки (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.), простейшие (лямблии, трихомонады). Из возбудителей кишечных инфекций наиболее чувствительны возбудители дизентерии, брюшного тифа и паратифов. Наиболее чувствительны к фуразолидону <i>Shigella dysenteriae</i> spp., <i>Shigella flexneri</i> spp., <i>Shigella boydii</i> spp., <i>Shigella sonnei</i> spp., <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> . Слабо влияет на возбудителей гнойной и анаэробной инфекций. Не действует на анаэробные микроорганизмы, синегнойную палочку [4, 5, 47, 53].	Для наружного применения: инфицированные раны и ожоги [4, 5, 47, 53]. Для приема внутрь: дизентерия, паратифы, пищевые токсикоинфекции, трихомониаз (при неэффективности нитроимидазолов), шигеллез, лямблиоз [2, 4, 5, 53].
Фуразидин	Грамположительные кокки (<i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.), грамотрицательные палочки (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.), простейшие (лямблии). Мало чувствительны – <i>Enterococcus</i> spp. Устойчивы – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , большинство штаммов <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp [4, 5, 47, 52].	Для местного и наружного применения: инфекционно-воспалительные заболевания полости рта и глотки, инфицированные раны (ссадины, царапины, небольшие порезы и расчесы, трещины, легкие ожоги и др.) [5]. Для приема внутрь – инфекционно-воспалительные заболевания мочевыводящих путей (пиелонефрит, цистит, уретрит), инфекции женских половых органов, профилактика инфекций при урологических операциях, цистоскопии, катетеризации [2, 4, 5, 47, 53].

Фурасол (активное вещество фуразидин калия) применяется местно, наружно. Раствор готовят непосредственно перед применением. Местно, при комплексном лечении инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и ротоглотки: содержимое пакетика растворяют в 200 мл горячей кипяченой воды и теплый раствор используют для полоскания полости рта и ротоглотки 2–3 раза в день, а также для промывания небольших инфицированных ран 1–2 раза в день. Продолжительность лечения 3–5 дней [4, 53].

Фурагин (фуразидин) таблетки 0,05 г применяется внутрь, после еды, запивая большим количеством жидкости, по 0,1–0,2 г 2–3 раза в сутки. Курс лечения – 7–10 дней (в зависимости от тяжести заболевания и функционального состояния почек). При необходимости курс лечения повторяют через 10–15 дней [2, 5, 47].

Нитрофураны практически не оказывает побочных реакций при наружном применении, обычно хорошо переносятся, кроме очень редко проявляю-

щихся аллергических реакций. В отдельных случаях возможно развитие дерматитов.

При приеме внутрь возможны диспепсические явления (снижение аппетита, тошнота, рвота), аллергические реакции (кожная сыпь, гиперемия и зуд кожи), нарушение функций печени, ЦНС (головная боль, головокружение, полиневрит) [5].

На сегодняшний день в России, зарегистрированы следующие ЛФ нитрофуранов, используемых для наружного применения (таблица 4).

На российском фармацевтическом рынке также присутствуют комбинированные ЛП, содержащие нитрофуран. Поликомпонентная мазь Фастин, содержащая фурацилин в концентрации 2%, синтомицин и анестезин, применяется при лечении ожогов I–III степени и различных гнойных ран. Альгипор – лиофилизированный гель, содержащий фурацилин, альгинат натрия и глюконат кальция, оказывающий антимикробное, адсорбирующее, ранозаживляющее действие. ОАО «Лужский завод «Белкозин» (Россия) производит губку гемостатическую коллагеновую, в

Таблица 4. ЛФ нитрофуранов и их производители на российском фармацевтическом рынке

Table 4. LF nitrofurans and their manufacturers in the Russian pharmaceutical market

МНН	Форма выпуска	Торговое наименование, производители
Нитрофуран	Таблетки для приготовления раствора для наружного применения, 0,02 г	Фурацилин: ЗАО «ПФК «Обновление»; ООО «ЮжФарм»; ООО «Квадрат-С»; ЗАО «Филевское оптово-розничное предприятие»; ОАО «Усолье-Сибирский химико-фармацевтический завод»; ОАО «Авексима»; АО «Татхимфармпрепараты»; ОАО «Ирбитский химфармзавод»; ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ», Россия Фурацилин-ЛекТ: ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод».
	Раствор для местного и наружного применения 0,02%	Фурацилин: ПАО «Биосинтез»; ОАО «Самарамедпром»; ОАО «Усолье-Сибирский химико-фармацевтический завод»; ОАО «Авексима»; ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»; ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика»; ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика»; ООО «Акафарм»; ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ», Россия; СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь; Фурацилин-СФ: ООО «Сфера-Фарм».
	Раствор для наружного применения (спиртовой)	Фурацилина раствор спиртовой 1:1500: ООО «Тульская фармацевтическая фабрика».
	Таблетки шипучие для приготовления раствора для местного и наружного применения, 0,02 г	Фурацилин Авексима: ОАО «Авексима», Россия.
	Мазь для наружного применения 0,2%	Фурацилиновая мазь 0,2%: ЗАО «Ярославская фармацевтическая фабрика», Россия.
Фуразолидон	Таблетки 0,05 г	Фуразолидон: ООО «ФармТехнологии»; ОАО «ДАЛЬХИМФАРМ»; ОАО «Авексима»; ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод» Россия; ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь.
Фуразидин	Порошок для приготовления раствора для местного и наружного применения 0,1 г	Фурасол: АО «Олайнфарм», Латвия [5, 53].
	Таблетки для приема внутрь 0,025 г; 0,05 г	Фурагин-ЛекТ: ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод»; Фурагин: ООО «Озон»; ЗАО «ФП «Оболенское»; Россия; АО «Олайнфарм», Латвия; Фурагин-СЗ: ЗАО «Северная звезда», Урофурагин: АО «Адамед Консьюмер Хелскеа», Польша.
	Капсулы для приема внутрь 0,05 г	Фурагин-Активур: ЗАО «ФП «Оболенское», Россия; Фурамаг: АО «Олайнфарм», Латвия.

состав которой входят борная кислота, нитрофурал, коллаген [54].

ООО «ЭСКО-ФАРМ» выпускает гигиенические средства «Фурацилин Виалайн спрей» (45 мл) и «Фурацилин Виалайн готовое полоскание» (200 мл), содержащие в своем составе нитрофурал, жидкий экстракт чабреца и дубровника, использующиеся для гигиены и профилактики заболеваний полости рта.

Одной из особенностей препаратов нитрофуранового ряда, ограничивающих их применение в виде ЛФ для наружного применения является очень малая (нитрофурал, фуразидин) или практически не растворимость (фуразолидон) в воде. Для фуразидина проблема растворимости в воде была решена путем создания солевой формы. Однако повышение растворимости фурацилина и фуразолидона остается актуальной задачей. Работы по увеличению растворимости, улучшению активности, фармакокинетических характеристик и показателей безопасности нитрофуранов велись со дня появления их первых представителей [2].

За последние годы опубликован ряд работ, посвященный повышению растворимости фурацилина в воде [6, 7, 14], также в научной литературе описано большое количество примеров использования фурацилина как в составе однокомпонентных, так и комплексных ЛП, в том числе при разработке мягких ЛФ для наружного применения.

В ряде работ фурацилин используется как действующее вещество (ДВ) в мягких ЛФ – мазях и гелях, используемых для лечения различных бактериальных, грибковых заболеваний кожи человека и животных. Патент RU2618087 описывает способ получения мази на основе растительного сырья для лечения ожогов с введением фурацилина в концентрации 0,06%, обладающей повышенным противовоспалительным, регенерирующим, антиоксидантным и антимикробным действием [8].

«Антимикробная композиция для лечения ран и ожогов» в изобретении RU2481834 выполнена в виде геля и содержит биокомплекс метронидазола с цинком, биокомплекс фурацилина (в концентрации 0,01–0,02%) с медью, тримекаин, витамины (витамин А, витамин Е, витамин РР, витамин С или их смесь), димексид, гидрогель метилкремниевой кислоты, гидрофильную основу и воду. В качестве гидрофильной основы используются водорастворимые производные целлюлозы [9].

Т. Ф. Маринина, Л. А. Логвинова, Л. Н. Савченко, С. В. Шабалин и др. предлагают введение фурацилина в ферментативно очищающую мазь, применяемую в стоматологии и содержащую дополнительно левомецетин, химотрипсин, сок каланхоэ, полиэтиленгликоль и глицерин, как один из способов лечения заболеваний парадонта и слизистой оболочки рта [10].

В патенте RU2445075 предлагается способ комплексного лечения абсцессов и флегмон челюстно-лицевой области у детей мазью с фурацилином (0,02%),

лидокаином и дибунолом. В качестве мазовой основы выступает сополимер стирола с малеиновым ангидридом, лутрол F-127, и вода очищенная. Использование изобретения сокращает сроки очищения за счет выраженного и пролонгированного лечебного действия: дренирующего, противовирусного, противомикробного, противовоспалительного, анестезирующего и др. [11].

В изобретении RU2218167 раскрывается способ получения средства для лечения инфицированных ран, содержащего мед пчелиный, фурацилин (0,04–0,041%), метилурацил, цитрат натрия трехзамещенный, кислоту янтарную, фосфаден, масло облепиховое, винилин, ПВП. Результатом является повышение эффективности композиции [12].

Авторами Е. Л. Атьковой и М. В. Сидоровой описан «Способ консервативного лечения дакриостеноза» и приведен состав глазного геля, содержащего фурацилин в концентрации, соответствующей его низкой растворимости в воде (1:4200). В основе предлагаемого способа лежит идея использовать способность глазного геля на основе фурацилина оказывать многогранное действие на слизистую оболочку слезоотводящих путей. Результат лечения достигается за счет высокой вязкости и структурированности гелевой структуры по сравнению с растворами, обеспечивающей длительное механическое воздействие, способствующее расширению слезоотводящих путей [13].

Несмотря на почти 70 лет прошедшие с момента разработки фуразолидона советскими учеными в 50-х годах XX столетия данное вещество относится к ДВ, не потерявшим актуальности и по сей день. В научной литературе за последние годы встречается большое количество запатентованных составов и технологий, включающих в качестве ДВ фуразолидон.

В патенте CN103536592A предложен «Метронидазол-фуразолидоновый вагинальный саморазвертывающийся суппозиторий, способ его получения и способ обнаружения». Изобретение представляет собой полый двухслойный суппозиторий, который содержит быстро высвобождающуюся часть и часть с медленным высвобождением, выполненный из лекарственной матрицы, содержащей ДВ и основной матрицы, а также расширяющегося носителя. В качестве ДВ суппозитории содержат метронидазол и фуразолидон, а также квасцы, борнеол и ладан. Средство предотвращает вытекание лекарственной жидкости и обладает высокой стабильностью, эффектом быстрого и пролонгированного ингибирования бактерий, что способствует предотвращению вторичной инфекции и повышению эффективности лечения [15].

В патенте RU2354385C2 описывается ряд ЛФ для лечения кандидозных вульвовагинитов: пессарии, мягкие желатиновые капсулы, мазь, крем, гель, суспензия, таблетки и вагинальные суппозитории, в которых активными компонентами являются фуразолидон, обладающий антимикотическим действием, и пребиотик. В группе пациенток, получавших лечение этими препа-

ратами не зарегистрировано побочных эффектов. После проведенного курса лечения в течение 6 месяцев рецидива кандидозной вагинальной инфекции зарегистрировано не было [16].

В патенте RU2667974C2 упоминается возможность создания перспективной ЛФ – гидрогеля комплексного соединения фуразолидона с кобальтом – эффективной для лечения инфицированных ран в хирургии [17].

В патенте CN102302448A описан способ получения наноземлюли фуразолидона типа масло в воде. В состав препарата входят: фуразолидон, суфрактант, масло, вода и поверхностно-активные вещества. Технология повышает растворимость, стабильность и биодоступность фуразолидона, замедляет время его метаболизма *in vivo* [18].

Также существует большое количество исследований, посвященных пероральному применению фуразолидона, обусловленных его антипротозойной и антибактериальной активностью в отношении *Helicobacter pylori*. Так ряд авторов рекомендует использовать схемы лечения с фуразолидоном при повышенной резистентности *H. pylori* к препаратом первой и второй линии [19]. Невысокая стоимость препарата обуславливает его широкое применение в странах с низким доходом населения. А медленное развитие резистентности является большим преимуществом, так, в Китае была выявлена резистентность к фуразолидону на уровне 8,7%, что послужило причиной активного изучения и разработки ЛП на основе фуразолидона [20–22].

Разработан ряд ЛФ фуразолидона для перорального применения: таблетки [23], таблетки с пролонгированным высвобождением [24], капсулы с кишечнорастворимым покрытием, повышающим бактериологический эффект вследствие повышения терапевтической концентрации в кишечнике [25]. Разработано средство, обеспечивающее «сопутствующее и контролируемое высвобождение» фуразолидона и висмута (III), включенных в сшитый гидрогель альгинат-карбоксиметилцеллюлозы натрия [26].

Предложены мукоадгезивные липосомальные системы доставки фуразолидона, действующие локально в желудке и позволяющие избежать побочных эффектов [27]. Полное уничтожение *H. pylori* было достигнуто через 2,5 часа после применения липосом состава фуразолидона с N-ацетилцистеином [28].

Проводятся исследования эффективности и безопасности применения различных схем лечения с фуразолидоном. Установлено, что комплекс с куркумином может быть перспективным средством для снижения его токсичности. Доказано, что куркумин ослабляет фуразолидон-индуцированное повреждение ДНК и апоптоз в клетках гепатоцитов L02 человека путем ингибирования продукции АФК и митохондриального пути [29]. Результаты подобных исследований подтверждают, что куркумин может предотвращать фуразолидон-индуцированную цитотоксичность и остановку S-фазы [30, 31].

Весьма активно ведутся разработки ЛП с фуразолидоном в области ветеринарии. В патенте RU2085207C1 описано изготовление суппозиторий, которые включают фуразолидон, диметилсульфоксид, карбахолин, противовоспалительное вещество на растительной основе и в качестве наполнителя – полиэтиленоксид. Внутриматочное средство используется как для профилактики, так и для лечения эндометрита у коров. Оно обладает наряду с противомикробным действием высокой противовоспалительной активностью, что приводит к сокращению срока излечения животных и уменьшению расхода препарата [32].

Разработан комбинированный препарат для лечения желудочно-кишечных болезней телят, протекающих с признаками диареи [33].

Фурагин (фуразидин) является одним из самых популярных нитрофуранов и широко используется в ряде изобретений в качестве ДВ для лечения кровоточащих травматических повреждений, плоских гранулирующих вялотекущих ран в стадии регенерации, ожогов II и IIIa степеней, трофических язв, пролежней при заживлении донорских участков, а также в качестве косметических средств в виде масок для лица, компрессов после косметических процедур и т.д.

Разработана композиция для лечения ран [34], изготовленная на основе природных биополимеров и представляющая собой полиэлектролитный белково-полисахаридный комплекс, ковалентно сшитый полифункциональными эпоксисоединениями с добавлением различных ДВ, например, фуразидина. Изделие на основе композиции может быть выполнено в виде коллоидного раствора, гидрогеля, пленки, губки, порошка, косметической маски, косметического компресса.

Изделия проявляют хорошо выраженное гемостатическое действие, ускоряют процессы регенерации и эпителизации, хорошо абсорбируют экссудат, сохраняя целостность после абсорбции, обеспечивают пролонгированный выход в рану иммобилизованных препаратов, снимают болевые ощущения, обладают антимикробной активностью, способны к биодеградации, поддерживают поступление кислорода в область раны, являются барьером для проникновения микробов, не токсичны, сокращают время лечения и просты в использовании. При использовании в качестве масок в косметологии изделия имеют отличную гидратирующую способность, легко и полно удаляются.

Высокая растворимость в воде калиевой соли фуразидина, открывает широкие возможности применения этого ДВ в различных ЛФ. Особенно часто как противомикробное средство фурагин используют в перевязочных средствах.

Повязка для закрытия и лечения ожогов описана в патенте RU2275179C2. В повязке текстильным носителем ДВ лечебного слоя может являться перфорированное хлопчатобумажное трикотажное полотно или сетка, где перфорация полотна выполнена в виде сквозных каналов, суммарная площадь отверстий,

которых составляет от 20% до 40% общей площади. Лечебный слой пропитан водным раствором полиэтиленгликолей и в качестве ДВ антисептического и анестезирующего действия может содержать: хлоргексидин, фурагин, йодопирон, повидон йода, хинозол или диоксидин. Поверх лечебного слоя расположен сорбционный слой, выполненный из нетканого полотна, который обеспечивает сорбционную способность повязки не менее 10 г/г [35].

Салфетка для лечения ран используется в лечебно-профилактических целях для лечения лучевых реакций при проведении курса радиотерапии. Содержит льно-вискозный носитель с нанесенным полимером – альгинатом натрия и введенным в него ДВ. В качестве ДВ могут быть нанесены такие малорастворимые препараты, как фурагин, метронидазол, 5-фторурацил, мексидол, а также биологически активные вещества – прополис, экстракты облепихи и черники [36].

Еще одно изобретение относится к получению биополимерных волокон из хитозана методом электроформования и нетканого волокнисто-пористого материала на их основе для получения полотна биомедицинского назначения в качестве биологической повязки для лечения ран. В качестве противомикробного ДВ используются фурагин и др. [37].

Предлагаемое патентом RU2626671C2 лекарственное средство (ЛС) выполнено в виде порошка и содержит азотосодержащее ДВ, генерирующее монооксид азота в пораженной ткани, например, фурагин или его калиевую соль, и дополнительно цитохром С, аскорбиновую кислоту или натрия аскорбат, цинка оксид, и вспомогательные вещества. Оксид азота оказывает опосредованное благоприятное действие на раневую и воспалительный процесс, усиливая секрецию цитокинов, индуцируя фагоцитоз бактерий и некротического детрита нейтрофилами и макрофагами, способствуя эндотелиальной релаксации и агрегации тромбоцитов. Таким образом высокая эффективность при лечении долго незаживающих поражений мягких тканей организма обусловлена высокой генерацией монооксида азота в пораженной ткани и его антиоксидантной, антимикробной и особенно вазодилаторной активности за счет совместного введения в состав ДВ. А также противовоспалительным, абсорбирующим и подсушивающим действием за счет введения в состав цинка оксида [38].

Представленное в патенте RU2247580C2 изобретение предназначено для первичной обработки ран и представляет собой многослойный материал из гидрофильного текстильного материала, покрытого по меньшей мере двумя слоями биосовместимого и биоразлагаемого полимера с иммобилизованными ЛС. Слой расположенный на текстильном материале содержит антимикробное средство (фуразидин) и другие дополнительные, а наружный слой, обращенный к ране – анестезирующее и антимикробное, возможно гемолитическое ЛС. Наложение повязки снимает болевой синдром, ускоряет процесс заживления и сокра-

щает время лечения благодаря атравматической смене условий лечения без замены повязок [39].

Предложено средство для местного консервативного лечения красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта. Предлагаемое средство содержит в качестве гидрофильной мукоадгезивной основы кремнийхитозансодержащий глицерогидрогель, и слабокислый водный раствор хитозана, а в качестве ДВ используют фурагин и анестезин. Способ лечения предполагает нанесение средства на пораженные участки поверхности слизистой оболочки путем аппликации. Средство обладает выраженной ранозаживляющей и регенерирующей активностью, может применяться как в качестве самостоятельного ЛС, так и в комплексной терапии при всех формах красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта [40].

Мазь для лечения ран, содержит в качестве активного компонента масло семян тыквы и основу, из полиэтиленгликоля-1500 или его смеси с полиэтиленгликолем-400, а в качестве ДВ антимикробный агент: димексид, фурагин, хлоргексидин или их смеси. Заявленное средство снижает число гнойных осложнений огнестрельных ран, ускоряет очищение и заживления раны и заполнение ее грануляционной тканью [41].

Известен биоразлагаемый шовный хирургический материал с покрытием, где ядро нити представлено полиамидной крученой или плетеной нитью, а пленочное покрытие является оболочкой из биоразлагаемого полимера, представляющей собой полимолочную кислоту, содержащую ДВ – фурагин [42].

Также фурагин востребован в медицине и ветеринарии для лечения бактериальных вагинальных инфекций [43]. Предложено лечебно-профилактическое средство для телят, содержащее сульфадимезин, фурагин, рибофлавин, глюкозу и белотин. Средство позволяет при лечении ликвидировать патологический процесс и восстановить защитные силы организма, а при профилактике повысить неспецифическую резистентность организма [44].

Несмотря на то, что история использования нитрофуранов для наружного применения насчитывает более полувека, ДВ этой группы до сих пор находят широкое применение в лечении различных заболеваний благодаря широкому спектру действия и низкой резистентности микроорганизмов. Однако низкая растворимость фурацилина и фуразолидона значительно ограничивает возможности применения как существующих ЛС для наружного применения (таблеток), так и возможности разработки новых ЛП. Для фуразидина проблема низкой растворимости была решена путем создания солевой формы, растворимой в воде.

Одним из эффективных приемов повышения растворимости ДВ является метод получения твердых дисперсий (ТД). ТД – это би- или многокомпонентные системы, состоящие из ДВ и носителя, представляющие собой высоко диспергированную твердую фазу ДВ или молекулярно-дисперсные твердые растворы с частичным образованием комплексов переменного состава с материалом носителя [55].

В связи с этим на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) проводятся исследования, посвященные возможности получения ТД фурацилина и фуразолидона с полимерами для повышения их растворимости с целью дальнейшей разработки твердых (быстрорастворимых) и мягких (гелей) ЛФ.

Так, в изобретении RU2578456 раскрыт способ получения быстрорастворимых ЛФ фурацилина с повышенной фармацевтической биодоступностью. За счет образования ТД с поливинилпирролидоном-10000 достигается увеличение растворимости ДВ в воде в 2 раза по сравнению с исходным ДВ, а также увеличение скорости растворения вещества. Таким образом решается проблема низкой растворимости ДВ в воде. Изобретение дает возможность получения быстрорастворимых таблеток и гранул фурацилина [6, 7, 14, 55].

Повышение растворимости нитрофураля в воде дает возможность введения фурацилина в мягкие водорастворимые ЛФ. В настоящее время ведутся исследования по разработке состава и технологии гелей с ТД фурацилина. Получены стабильные составы с концентрацией ДВ 0,02% и 0,04%, проведена оценка качества разработанных составов по критериям нормативной документации, исследована их стабильность в процессе хранения, определен срок годности и условия хранения разработанных составов гелей фурацилина. Подана заявка на изобретение «Состав геля фурацилина (варианты) и способ его получения (варианты)».

Также ведутся работы по повышению растворимости и скорости растворения в воде ещё одного представителя группы нитрофуранов – фуразолидона методом ТД с использованием поливинилпирролидонов с различной молекулярной массой и полиэтиленгликолей с различной степенью полимеризации. На основе полученных ТД фуразолидона ведется разработка состава и технологии твердых (быстрорастворимых) ЛФ – гранул и таблеток, а также мягкой ЛФ – гелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка твердых (быстрорастворимых) и мягких (гелей) ЛФ производных нитрофурана (фурацилина и фуразолидона) с применением метода твердых дисперсий для повышения их растворимости является актуальной проблемой современной фармацевтической науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dann O., Moller E. F. Bacteriostatically action nitro compounds of thiophenes and furans. *Chemische Berichte*. 1947; 23–36.
2. Голуб А. В. Нитрофураны в терапии неосложненных инфекций мочевых путей. *Эффективная фармакотерапия. Урология и Нефрология*. 2010; 3.
3. Закиревский В. В., Лелеко С. Н. Загрязненность мясного сырья нитрофуранами один из индикаторов небезопасности пищевой продукции для потребителей. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2012; 3(44): 96–99.

4. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна. 2016: 1216.
5. Регистр лекарственных средств России: РЛС. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_332.htm (accessed 16.01.2019).
6. Никулина О. И., Краснюк И. И., Беляцкая А. В. и др. Изучение высвобождения фурацилина из твердых дисперсий. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012; 46(12): 49–52.
7. Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И. (мл) и др. Разработка состава и технологии быстрорастворимых лекарственных форм фурацилина. *Фармация*. 2015; 3: 36–39.
8. Патент RU2618087. Противоожоговое средство на основе настоя листьев осины обыкновенной, цветков календулы лекарственной, ромашки лекарственной / Д. А. Арешидзе, М. А. Козлова, И. А. Сёмин; патентообладатель ГОУ ВПО Московский государственный областной университет. – Заявл. 12.02.2016; опублик. 02.05.2017.
9. Патент RU2481834. Антимикробная композиция для лечения ожогов и ран / Л. П. Лазурина, А. А. Краснов, А. С. Самофалов, В. О. Устищенко и др.; патентообладатель Лазурина Л. П. – Заявл. 31.08.2011; опублик. 20.05.2013.
10. Патент RU2151593. Способ лечения заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта / Т. Ф. Маринина, Л. А. Логвинова, Л. Н. Савченко, С. В. Шабалин и др.; патентообладатель Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Заявл. 25.06.1999; опублик. 27.06.2000.
11. Патент RU2445075. Способ комплексного лечения абсцессов и флегмон челюстно-лицевой области у детей мазью с фурацилином, лидокаином и дибуполом / Ю. В. Шикова, В. А. Лиходед, С. В. Чуйкин, Т. А. Хасанов, Д. Г. Шайбаков; патентообладатель Хасанов Т. А. – Заявл. 10.02.2011; опублик. 20.03.2012.
12. Патент RU2218167. Способ получения композиционного средства – мази «СВФ» / В. Ф. Старцев, Н. И. Старцева, В. В. Старцев; патентообладатель Старцева Н. И. – Заявл. 03.09.2001; опублик. 10.12.2003.
13. Патент RU2473335. Способ консервативного лечения дакриостеноза / Е. Л. Атькова, М. В. Сидорова; патентообладатель ФГБУ «НИИГБ «РАМНО». – Заявл. 22.02.2012; опублик. 27.01.2013.
14. Патент RU2578456. Способ получения быстрорастворимых лекарственных форм фурацилина (варианты) / И. И. Краснюк (мл.), О. И. Степанова, А. В. Беляцкая, И. И. Краснюк и др.; патентообладатель ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России. – Заявл. 29.12.2014; опублик. 27.03.2016.
15. Patent CN 103536592. Metronidazole-furazolidone vaginal expandable suppository and its preparation method and detection method / Qiu Xueliang, Qiu Mingshi; original assignee Harbin Otto Pharmaceutical Co.; QIU MINGSHI. – App. 11.10.2013; Pub. 08.04.2015.
16. Патент RU 2354385. Фармкомпозиция для лечения кандидозных вульвовагинитов / А. В. Диковский, О. В. Дорожко, Б. А. Рудой; патентообладатель А. В. Диковский. – Заявл. 14.02.2007; опублик. 10.05.2009.
17. Патент RU 2667974. Фармацевтическая комбинированная композиция для местного и наружного применения на основе диоксида / Е. В. Межбурд, Л. А. Блатун, М. У. Аринбасаров, В. И. Коган; патентообладатель ЗАО «БИС». – Заявл. 11.10.2016; опублик. 25.09.2018.
18. Patent CN 102302448. Oil-in-water furazolidone nano emulsion antibacterial medicament and preparation method thereof / B. Song, W. Ouyang, S. Ouyang; original assignee NWAUFU. – App. 25.08.2011; Pub. 04.01.2012.
19. Pellicano R., Zagari R.M., Zhang S. et al. Pharmacological considerations and step-by-step proposal for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in the year 2018. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2018; 64(3): 310–321.
20. Su Z., Xu H., Zhang C. et al. Mutations in *Helicobacter pylori* porD and oorD genes may contribute to furazolidone resistance // *Croat Med J*. 2006; 47(3): 410–415.
21. Xie Y., Zhang Z., Hong J. et al. Furazolidone-containing triple and quadruple eradication therapy for initial treatment for *Helicobacter pylori* infection: A multicenter randomized controlled trial in China. *Helicobacter*. 2018; 23.
22. Zhuge L., Wang Y., Wu S. et al. Furazolidone treatment for *Helicobacter Pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2014; 20(2).
23. Patent CN 103271887. Furazolidone tablet preparation method / Y. Mei, J. Li, G. Zhu, F. Chun; original assignee Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 07.0.2013; Pub. 05.11.2014.
24. Patent CN 104523636. The method of preparing a slow-release tablets and furazolidone / Y. Mei, J. Li; original assignee Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 25.12.2014; Pub. 18.07.2017.
25. Patent CN 104352478. A method of preparing formulation furazolidone / Y. Mei, J. Li, J. Zhang, G. Zhu; original assignee

- Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 18.11.2014; Pub. 22.02.2017.
26. Silva KMMN, de Carvalho DEL, Valente VMM et al. Concomitant and controlled release of furazolidone and bismuth (III) incorporated in a cross-linked sodium alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. *Int J Biol Macromol*. 2018; 17. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.136.
27. Alam M. I., Paget T., Elkordy A. A. Formulation and advantages of furazolidone in liposomal drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci*. 2016;10. Doi: 10.1016/j.ejps.2016.01.017.
28. Alam M. I., Irfan M. Formulation and advantages of furazolidone in spray dried and liposomal drug delivery systems. *University of Sunderland*. 2017; 18. ISBN: 0000 0004 6499 741X.
29. Dai C., Li D., Gong L. Curcumin Ameliorates Furazolidone-Induced DNA Damage and Apoptosis in Human Hepatocyte L02 Cells by Inhibiting ROS Production and Mitochondrial Pathway. *Molecules*. 2016; 21(8): 1061.
30. Dai C., Lei L., Li B. et al. Involvement of the activation of Nrf2/HO-1, p38 MAPK signaling pathways and endoplasmic reticulum stress in furazolidone induced cytotoxicity and S phase arrest in human hepatocyte L02 cells: modulation of curcumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2015; 29(10).
31. Deng S., Tang S., Dai C. P21Waf1/Cip1 plays a critical role in furazolidone-induced apoptosis in HepG2 cells through influencing the caspase-3 activation and ROS generation. *Food and Chemical Toxicology*. 2016; 1: 88.
32. Патент RU 2085207. Средство для лечения эндометрита у коров / А. А. Сайко, А. М. Бескровный, И. П. Котляренко, А. Д. Солдатов, Л. А. Ковпак; патентообладатель АО «БИОМОС». – Заявл. 15.02.1995; опубл. 27.07.1997.
33. Патент RU 2552755. Комбинированный препарат для лечения острых желудочно-кишечных болезней телят, протекающих с признаками диареи / С. Ш. Абдулмагомедов, Р. А. Нуратинов, А. Ю. Алиев, Р. М. Бакриева; патентообладатель ГНУ «Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт РАСН». – Заявл. 02.07.2013; опубл. 10.06.2015.
34. Патент RU 2467767. Композиция для лечения ран и изделия на ее основе / Л. И. Аванесова, В. В. Бояринцев, С. В. Добыш, А. В. Дружков, А. В. Костин, В. Б. Назаров, А. С. Самойлов, Э. В. Фрончек, В. В. Хван; патентообладатель Э. В. Фрончек. – Заявл. 10.05.2011; опубл. 27.11.2012.
35. Патент RU 2275179. Повязка для закрытия и лечения ожогов / А. А. Алексеев, А. Э. Бобровников, Т. С. Васильева, М. Г. Крутиков, О. А. Субботко; патентообладатель А. А. Алексеев, А. Э. Бобровников, Т. С. Васильева, М. Г. Крутиков, О. А. Субботко. – Заявл. 22.07.2004; опубл. 27.04.2006.
36. Патент RU 2483755. Салфетка для лечения ран / Н. Д. Олтаржевская, М. А. Коровина, М. И. Валуева, Г. Е. Кричевский; патентообладатель ООО «ЮЛТЕКС». – Заявл. 26.04.2012; опубл. 10.06.2013.
37. Патент RU 2468129. Биополимерное волокно, состав формовочного раствора для его получения, способ приготовления формовочного раствора, полотно биомедицинского назначения, способ его модификации, биологическая повязка и способ лечения ран / А. Б. Шиповская, Н. В. Островский, Ю. Е. Сальковский, Е. В. Козырева, Ю. А. Дмитриев, И. Б. Белянина, В. В. Березяк, О. И. Александрова, И. В. Кириллова, Д. В. Перминов; патентообладатель СГУ им. Н. Г. Чернышевского, Д. В. Перминов. – Заявл. 30.12.2010; опубл. 10.07.2012.
38. Патент RU 2626671. Лекарственное средство для лечения поражений мягких тканей организма / Н. Б. Мельникова, В. М. Коробко; патентообладатель ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России. – Заявл. 05.08.2015; опубл. 31.07.2017.
39. Патент RU 2247580. Многослойный материал пролонгированного лечебного действия / С. Н. Болдырев; патентообладатель С. Н. Болдырев. – Заявл. 04.03.2003; опубл. 10.03.2005.
40. Патент RU 2583945. Средство для местного лечения красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта и способ лечения красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта / П. Б. Жовтяк, С. С. Григорьев, Т. Г. Хонина, Е. В. Шадрина, О. Н. Чупахин, Л. П. Ларионов, Г. И. Ронь, Н. Д. Чернышева, Н. А. Попова; патентообладатель ИОС Уро РАН. – Заявл. 13.05.2015; опубл. 10.05.2016.
41. Патент RU 2432156. Мазь для лечения ран / В. Ю. Михалев; патентообладатель ООО «САЛЕН». – Заявл. 19.04.2010; опубл. 27.10.2011.
42. Патент RU 115663. Биоразлагаемый шовный хирургический материал с покрытием / С. В. Шкуренко, Е. В. Монахова, В. Е. Рыкалина, А. Г. Петров, Д. В. Боровиков, Е. М. Мохов, А. Н. Сергеев, А. В. Жеребченко; патентообладатель МИНПРОМТОРГ РОССИИ. – Заявл. 01.11.2011; опубл. 10.05.2012.
43. Patent EP 3388063. Treatment of a bacterial vaginal infection / S. Berdzik-Kalarus; original assignee ADAMED SP ZOO. – App. 14.04.2017; Pub. 17.10.2017.
44. Патент RU 2165252. Лечебно-профилактическое средство для телят / П. Н. Сисягин, Р. Е. Ким, З. Я. Косорлукова, Г. Р. Реджепова, Г. В. Зоткин, И. В. Убитина; патентообладатель Научно-исследовательский ветеринарный институт Нечерноземной зоны РФ. – Заявл. 29.11.1999; опубл. 20.04.2001.
45. Перепанова Т. С., Хазан П. Л. Применение нитрофуранов при инфекции мочевых путей. *Эффективная фармакотерапия. Урология и Нефрология*. 2007: 4.
46. Новиков О. О. Формирование новых подходов к анализу и дальнейшему использованию лекарственных средств группы 5-нитрофурана: дис. д. ф. н. М., 2002: 354.
47. Vidal. Справочник лекарственных средств. 2016. Available at: <https://www.vidal.ru> (accessed 23.01.2019).
48. Глущенко Н. Н., Плетенева Т. В., Попков В. А. Фармацевтическая химия: учебник. — М.: Академия. 2004: 382.
49. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 3. М., 2018: 7019.
50. European Pharmacopoeia. 8th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2014; 2: 2569.
51. United States Pharmacopoeia 40-NF35. 4346 p.
52. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Available at: <http://www.antibiotic.ru/ab/063-64.shtml> (accessed 23.01.2019).
53. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> (accessed 26.01.2019).
54. Кухтенко Г. П., Кухтенко А. С., Капселямова Э. Н. и др. Разработка состава и технологии противогрибковой мягкой лекарственной формы. *Медицина*. 2014; 1: 6–9.
55. Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Краснюк И. И. и др. Перспективы применения твердых дисперсий с поливинилпирролидоном в медицине и фармации. *Фармация*. 2016; 6: 7–11.

REFERENCES

1. Dann O., Moller E. F. Bacteriostatically action nitro compounds of thiophenes and furans. *Chemische Berichte*. 1947; 23–36 (In Germany).
2. Golub A.V. Nitrofurans in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *Effective pharmacotherapy. Urology and Nephrology*. 2010; 3 (In Russ.).
3. Zakirevsky V. V., Leleko S. N. Contamination of raw meat with nitrofurans is one of the indicators of the insecurity of food products for consumers. *Preventive and Clinical Medicine*. 2012; 3(44): 96–99 (In Russ.).
4. Mashkovsky M. D. Medicines. 16+ ed., rev., corr. and add. – M.: The New Wave. 2016: 1216. (In Russ.).
5. Register of medicines of Russia: RLS. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_332.htm (accessed 16.01.2019) (In Russ.).
6. Nikulina O. I., Krasnyuk I. I., Belyatskaya A. V. et al. Study of furacilin release from solid dispersions. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2012; 46(12): 49–52 (In Russ.).
7. Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I. (Jr.) et al. Development of the composition and technology of instant dosage forms of furacilin. *Pharmacy*. 2015; 3: 36–39 (In Russ.).
8. Patent RU2618087. Antiburn agent based on infusion of aspen leaves of ordinary, calendula flowers, chamomile / Areshidze D. A., Kozlova M. A., Semin I. A.; patent holder Sechenov University. – Appl. 12.02.2016; publ. 02.05.2017. (In Russ.).
9. Patent RU 2481834. Antimicrobial composition for the treatment of burns and wounds / Lazurin L. P., Krasnov A. A., Samofalov A. S., Ustimenko V. O. et al.; Patent holder Lazurin L.P. – Appl. 31.08.2011; publ. 20.05.2013 (In Russ.).
10. Patent RU 2151593. A method for the treatment of periodontal diseases and oral mucosa / Marinina T. F., Logvinova L. A., Savchenko L. N., Shabalin S. V. et al.; Patent holder Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy. – Appl. 25.06.1999; publ. 27.06.2000 (In Russ.).
11. Patent RU 2445075. The method of complex treatment of abscesses and phlegmon of the maxillofacial area in children with ointment with furacilin, lidocaine and dibunol / Shikova Yu. V., Lihoded V. A., Chuikin S. V., Khasanov T. A., Shaybakov D. G.; Patent owner Khasanov T. A. – Appl. 10.02.2011; publ. 20.03.2012 (In Russ.).
12. Patent RU2218167. The method of obtaining a composite tool – ointment «SVF» / Startsev V. F., Startseva N. I., Elders V. V.; Patent holder Startseva N. I. – Appl. 03.09.2001; publ. 10.12.2003 (In Russ.).

13. Patent RU2473335. The method of conservative treatment of dacryostenosis / Atkova E. L., Sidorov M. V.; Patent holder FSBI RIED – Appl. 22.02.2012; publ. 27.01.2013 (In Russ.).
14. Patent RU 2578456. A method of obtaining instant furacilina dosage forms (options) / Krasnyuk I. I. (Jr.), Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I. et al.; Patent holder Sechenov University. – Appl. 29.12.2014; publ. 27.03.2016 (In Russ.).
15. Patent CN 103536592. Metronidazole-furazolidone vaginal expandable suppository and its preparation method and detection method / QiuXueliang, QiuMingshi; original assignee Harbin Otto Pharmaceutical Co; QIU MINGSHI. – App. 11.10.2013; Pub. 08.04.2015 (In China).
16. Patent RU 2354385. Pharm composition for the treatment of vulvovaginal candidiasis / Dikovskiy A. V., Dorozhko O. V., Ore B. A.; Patent holder Dikovskiy A. V. – Appl. 14.02.2007; publ. 10.05.2009 (In Russ.).
17. Patent RU 2667974. Pharmaceutical combined composition for local and external use based on dioxidine / Mezhibud E. V., Blatun L. A., Arinbasarov M. U., Kogan V. I.; Patent holder ZAO «BIS». – Appl. 11.10.2016; publ. 25.09.2018 (In Russ.).
18. Patent CN 102302448. Oil-in-water furazolidonenano emulsion antibacterial medicament and preparation method thereof / Song B., Ouyang W., Ouyang S.; original assignee NFAFU. – App. 25.08.2011; Pub. 04.01.2012 (In China).
19. Pellicano R., Zagari R.M., Zhang S. et al. Pharmacological considerations and step-by-step proposal for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in the year 2018. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018; 64(3): 310–321 (In Italy).
20. Su Z., Xu H., Zhang C. et al. Mutations in *Helicobacter pylori* *porD* and *oorD* genes may contribute to furazolidone resistance. *Croat Med J.* 2006; 47(3): 410–415 (In China).
21. Xie Y., Zhang Z., Hong J. et al. Furazolidone-containing triple and quadruple eradication therapy for initial treatment for *Helicobacter pylori* infection: A multicenter randomized controlled trial in China. *Helicobacter.* 2018; 23 (In China).
22. Zhuge L., Wang Y., Wu S. et al. Furazolidone treatment for *Helicobacter Pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter.* 2014; 20(2) (In China).
23. Patent CN 103271887. Furazolidone tablet preparation method / Mei Y., Li J., Zhu G., Chun F.; original assignee Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 07.0.2013; Pub. 05.11.2014 (In China).
24. Patent CN 104523636. The method of preparing a slow-release tablets and furazolidone / Mei Y., Li J.; original assignee Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 25.12.2014; Pub. 18.07.2017 (In China).
25. Patent CN 104352478. A method of preparing formulation furazolidone / Mei Y., Li J., Zhang J., Zhu G.; original assignee Kunming Zhenhua Pharmaceutical Factory Co. – App. 18.11.2014; Pub. 22.02.2017 (In China).
26. Silva KMMN, de Carvalho DEL, Valente VMM et al. Concomitant and controlled release of furazolidone and bismuth (III) incorporated in a cross-linked sodium alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 17. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.136. (In Brasil).
27. Alam M. I., Paget T., Elkordy A. A. Formulation and advantages of furazolidone in liposomal drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 10. Doi: 10.1016/j.ejps.2016.01.017. (In Brit.).
28. Alam M. I., Irfan M. Formulation and advantages of furazolidone in spray dried and liposomal drug delivery systems. *University of Sunderland*, 2017: 18. ISBN: 0000 0004 6499 741X. (In Brit.).
29. Dai C., Li D., Gong L. Curcumin Ameliorates Furazolidone-Induced DNA Damage and Apoptosis in Human Hepatocyte L02 Cells by Inhibiting ROS Production and Mitochondrial Pathway. *Molecules.* 2016; 21(8): 1061. (In China).
30. Dai C., Lei L., Li B. et al. Involvement of the activation of Nrf2/HO-1, p38 MAPK signaling pathways and endoplasmic reticulum stress in furazolidone induced cytotoxicity and S phase arrest in human hepatocyte L02 cells: modulation of curcumin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 2015; 29(10). (In China).
31. Deng S., Tang S., Dai C. P21Waf1/Cip1 plays a critical role in furazolidone-induced apoptosis in HepG2 cells through influencing the caspase-3 activation and ROS generation // *Food and Chemical Toxicology.* 2016; 1: 88. (In China).
32. Patent RU 2085207. Agent for the treatment of endometritis in cows / Saiko A. A., Bloodless A. M., Kotlyarenko I. P., Soldatov A. D., Kovpak L. A.; Patent holder AO«BIOMOS». – Appl. 15.02.1995; publ. 27.07.1997 (In Russ.).
33. Patent RU 2552755. Combined medication for the treatment of acute gastrointestinal diseases of calves with diarrhea / Abdulmagomedov S. S., Nuratinov R. A., Aliyev A. Y., Bakriev R. M.; Patent holder Pre-Caspian Regional Veterinary Research Institute PACN. – Appl. 02.07.2013; publ. 10.06.2015 (In Russ.).
34. Patent RU 2467767. Composition for the treatment of wounds and products based on it / Avanesova L. I., Boyarintsev V. V., Dobish S. V., Druzhkov A. V., Kostin A. V., Nazarov V. B., Samoilov A. S., Fronchek E. V., Hwang V. V.; Patent holder Fronchek E. V. – Appl. 10.05.2011; publ. 27.11.2012 (In Russ.).
35. Patent RU 2275179. Bandage for the closure and treatment of burns / Alekseev A. A., Bobrovnikov A. E., Vasiliev T. S., Krutikov M. G., Subbotko O. A.; Patent holder Alekseev A. A., Bobrovnikov A. E., Vasiliev T. S., Krutikov M. G., Subbotko O. A. – Appl. 22.07.2004; publ. 27.04.2006 (In Russ.).
36. Patent RU 2483755. Napkin for the treatment of wounds / Oltarzhevskaya N.D., Korovin M.A., Valuev M.I., Krichesky G.E.; Patent holder OOO «KOLETEX». – Appl. 26.04.2012; publ. 10.06.2013. (In Russ.).
37. Patent RU 2468129. Biopolymer fiber, the composition of the molding solution for its production, the method of preparation of the molding solution, the cloth for biomedical purposes, the method of its modification, the biological dressing and the method of treatment of wounds / Shipovskaya A. B., Ostrovsky N. V., Salkovsky Yu. E., Kozyreva E. V., Dmitriev Yu. A., Belyanin I. B., Bereziak V. V., Alexandrova O. I., Kirillova I. V., Perminov D. V.; Patent holder SSU named Chernyshevsky N.G. in Perminov. – Appl. 30.12.2010; publ. 10.07.2012 (In Russ.).
38. Patent RU 2626671. Drug for the treatment of lesions of the soft tissues of the body / Melnikova N. B., Korobko V. M.; Patent holder FSBEI HE PRMU MOH Russia. – Appl. 05.08.2015; publ. 31.07.2017 (In Russ.).
39. Patent RU 2247580. Multiple material of prolonged therapeutic action / Boldyrev S. N.; Patent holder Boldyrev S. N. – Appl. 04.03.2003; publ. 10.03.2005 (In Russ.).
40. Patent RU 2583945. Means for local treatment of lichen planus of the oral mucosa, and a method of treating planus oral mucosa / Zhovtyak P. B., Grigoriev S. S., Khonina T. G., Shadrina E. V., Chupakhin O. N., Larionov L. P., Rogn G. I., Chernysheva N. D., Popova N. A.; Patent holder IOS UrB RAS. – Appl. 13.05.2015; publ. 10.05.2016 (In Russ.).
41. Patent RU 2432156. Ointment for the treatment of wounds / Mikhalev V. Yu.; Patent owner OOO «SALEN» – Appl. 19.04.2010; publ. 27.10.2011 (In Russ.).
42. Patent RU 115663. Biodegradable surgical coated material / Shkurenko S. V., Monakhov E. V., Rykalina V. E., Petrov A. G., Borovikov D. V., Mokhov E. M., Sergeev A. N., Zherebchenko A. V.; Patent holder THE MINISTRY OF INDUSTRY AND TRADE RUSSIA. – Appl. 01.11.2011; publ. 10.05.2012 (In Russ.).
43. Patent EP 3388063. Treatment of a bacterial vaginal infection / S. Berdzik-Kalarus; original assignee ADAMED SP ZOO. – App. 14.04.2017; Pub. 17.10.2017 (In Europe).
44. Patent RU 2165252. Therapeutic and preventive agent for calves / Cesagen P. N., Kim R. E., Kosorukova Z. Y., Redzhepova G. R., Zotkin G. V., Ulitina I. V.; GNU NIVI NZ RUSSIA. – Appl. 29.11.1999; publ. 20.04.2001 (In Russ.).
45. Perepanova T. S., Hazan P. L. the use of nitrofurans in urinary tract infections. *Effective pharmacotherapy. Urology and Nephrology.* 2007: 4 (In Russ.).
46. Novikov O. O. Formation of new approaches to the analysis and further use of drugs of 5-nitrofur group: dis. d. p. s. M., 2002: 354 (In Russ.).
47. Vidal. Reference book of medicines. 2016. Available at: <https://www.vidal.ru> (accessed 23.01.2019) (In Russ.).
48. Glushchenko N. N., Pleteneva T. V., Popkov V. A. Pharmaceutical chemistry: textbook. — M.: Academy, 2004: 382. (In Russ.).
49. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. T. 3. M., 2018: 7019. (In Russ.).
50. European Pharmacopoeia. 8th ed. – Strasbourg: Council of Europe. 2014; 2: 2569. (In Europe).
51. United States Pharmacopoeia 40-NF35. 4346 p. (In USA).
52. Practical guide to anti-infectious chemotherapy. Available at: <http://www.antibiotic.ru/ab/063-64.shtml> (accessed 23.01.2019) (In Russ.).
53. State Register of Medicinal Remedies. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> (accessed 26.01.2019) (In Russ.).
54. Kuhtenko G. P., Kuhtenko A. S., Kapalamula E. N. etc. Development of composition and technology of antifungal soft medicinal forms. *Medicine.* 2014; 1: 6–9. (In Ukraine).
55. Krasnyuk I. I. (Jr.), Belyatskaya A. V., Krasnyuk I. I. et al. Prospects of application of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone in medicine and pharmacy. *Pharmacy.* 2016; 6: 7–11 (In Russ.).

Мягкая лекарственная форма с наночастицами для остановки кровотечения: обоснование состава и технология получения

Ю. Н. Барсукова^{1*}, О. А. Мельникова¹

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

*Контактное лицо: Барсукова Юлия Н. E-mail: iulija.barsukowa@yandex.ru, newfarmacia@mail.ru

Статья получена: 28.01.2019. Статья принята к печати: 22.04.2019

Резюме

Введение. В связи с ростом общехирургических заболеваний, лечение и остановка кровотечений является важной проблемой медицины и фармации. Имеющийся ассортимент гемостатиков не всегда соответствует потребностям медицинской практики и не обеспечивает широту выбора лекарственных средств. Учитывая большую потребность в лекарственных препаратах для остановки кровотечений, их разработка является актуальной задачей для современной фармацевтической промышленности. Одним из перспективных направлений является разработка гемостатической мази. Мягкие лекарственные формы с оптимальными реологическими показателями характеризуются хорошей степенью намазываемости и легкой экструзией из туб. В настоящей работе предложен состав и технология получения гемостатической мази с наноконпонентом.

Цель. Обоснование оптимального состава путем изучения реологических показателей и разработка технологии получения мази с наночастицами для остановки кровотечений.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила фармацевтическая субстанция кислота аминкапроновая (ФС.2.1.0001.15), железа III хлорид (ГОСТ 4147-74), наночастицы оксида железа (ГОСТ Р 57909-2017). Наночастицы, используемые в данной работе, получены левитационно-струйным методом в среде газа-носителя. В работе использованы технологические и физико-химические методы исследований. Методически подробно охарактеризован метод ротационной вискозиметрии на приборе вискотестер Haake VT550. Статистическую обработку результатов проводили по методикам ГФ XIV с использованием стандартных компьютерных программ.

Результаты и обсуждение. В результате проведения исследования установлено, что вязкость исследуемых образцов мази постепенно уменьшалась с увеличением скорости сдвига, но имела нелинейный характер. Данная зависимость характерна для систем с пластическим типом течения и характеризует исследуемые образцы как структурированную дисперсную систему. Также установлено, что образцы мазей с наночастицами обладали тиксотропными свойствами. Это, в свою очередь, служит показателем хорошей намазываемости и экструзии из туб.

Заключение. Предложена технология получения и спроектирована технологическая схема производства гемостатической мази с наночастицами.

Ключевые слова: гемостатик, реологические показатели, вязкость, наночастицы, предел текучести, технология получения.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Барсукова Ю. Н., Мельникова О. А. Мягкая лекарственная форма с наночастицами для остановки кровотечения: обоснование состава и технология получения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 48–54.

Soft Medical Form with Nanoparticles to Stop Bleeding: Substantiation of Composition and Technology of Obtaining

Yu. N. Barsukova^{1*}, O. A. Melnikova¹

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

*Corresponding author: Yuliya N. Barsukova. E-mail: iulija.barsukowa@yandex.ru, newfarmacia@mail.ru

Received: 28.01.2019. Accepted: 22.04.2019

Abstract

Introduction. Due to the growth of general surgical diseases, the treatment and cessation of bleeding is an important problem of medicine and pharmacy. The existing range of hemostatics does not always meet the needs of medical practice and does not provide a wide choice of drugs. Given the great need for drugs to stop bleeding, their development is an urgent task for the modern pharmaceutical industry. One of the promising areas of the creation of dosage forms is the development of hemostatic ointment. Soft dosage forms with optimal rheological characteristics are characterized by a good degree of spreading and easy extrusion of tubes. In the present work, the composition and technology of hemostatic ointment with a nanocomponent was proposed.

Aim. Justification of the optimal composition by studying the rheological parameters and the development of technology for producing a soft dosage form with nanoparticles to stop bleeding.

Materials and methods. The pharmaceutical substance was aminocaproic acid (FS.2.1.0001.15), iron III chloride (GOST 4147-74), iron oxide nanoparticles (GOST R 57909-2017). The nanoparticles used in this work were obtained by a levitation jet method in a carrier gas medium. The work used technological, physical and chemical research methods. The method of rotational viscometry on the instrument Haake VT550 viscometer is described methodically in detail. Statistical processing of the results was carried out according to the GF XIV methods using standard computer programs.

Results and discussion. As a result of the study, it was found that the viscosity of the ointment samples studied gradually decreased with an increase in shear rate, but was non-linear. This dependence is characteristic of systems with a plastic type of flow and characterizes the samples under study as a structured dispersed system. It was also found that the samples of the soft dosage form had thixotropic properties. This in turn serves as an indicator of good lubrication and extrusion of tubes.

Conclusion. A production technology has been proposed and a technological scheme for the production of a hemostatic soft dosage form with nanoparticles has been designed.

Keywords: hemostatic, rheological indices, viscosity, nanoparticles, fluidity limit, production technology.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Barsukova Yu. N., Melnikova O. A. Soft medical form with nanoparticles to stop bleeding: substantiation of composition and technology of obtaining. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 48–54.

ВВЕДЕНИЕ

Кровотечение является угрожающим и опасным спутником многих ранений, повреждений и операционных вмешательств. В связи с ростом общехирургических заболеваний, лечение и остановка кровотечений является важной проблемой медицины и фармации. Имеющийся ассортимент гемостатических лекарственных средств не всегда соответствует потребностям медицинской практики и не обеспечивает широту выбора [1]. Учитывая небольшую долю существующих в настоящее время гемостатических лекарственных средств в виде мягких лекарственных форм, разработка мази для остановки кровотечений является актуальной задачей современной фармацевтической промышленности.

Реологические параметры оказывают непосредственное влияние на качество, стабильность готовой лекарственной формы, высвобождение лекарственных веществ из мазевой основы, удобство и легкость нанесения, фасуемость и экструзию из туб [2]. Процесс нанесения и распределения мази на поверхности кожных покровов схож с процессом, происходящим во время сдвига вязкопластичного материала в ротационном вискозиметре, а затраченное усилие – напряжению сдвига, характеризующему сопротивляемость материала сдвиговым деформациям при определенной скорости. Поэтому важной задачей становится разработка мягкой лекарственной формы с оптимальными реологическими показателями, поскольку они объективно характеризуют качество и свойства лекарственных средств [3].

В рамках поставленной задачи нами был разработан состав гемостатического средства, включающий хлорид железа (III), аминокaproновую кислоту и наночастицы оксида железа (Fe_2O_3). При создании гемостатической мази принималось во внимание, что железо является действующим веществом многих известных лекарственных препаратов, входит в состав гемоглобина, миоглобина крови, а также ферментов организма. Аминокaproновая кислота по механизму действия относится к ингибиторам активаторов профибринолизина и тормозит его превращение в фибринолизин. Стимулирует образование тромбоцитов, sensibilизирует тромбоцитарные рецепторы к тромбину, тромбосану A_2 и другим эндогенным агрегантам [4]. Наночастицы оказывают антисептическое действие, улучшают проникновение действующих веществ в очаг кровотечения и пролонгирование эффекта [5]. В качестве водорастворимой основы использовали смесь полиэтиленгликолей (ПЭГ) с молекулярными массами 400 и 1000. Данная основа демонстрирует хорошую биосовместимость, биоразлагаемость и гидрофильность.

Целью исследования являлось обоснование состава путем изучения реологических показателей и разработка технологии получения мази с наночастицами для остановки кровотечений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

Таблица 1. Состав гемостатического средства

Table 1. The composition of the hemostatic agent

Ингредиент	Нормативная документация	Масса, г
Кислота Аминокaproновая	ФС.2.1.0001.15, ГФ XIII изд. ГОСТ 7850-2013	5,0
Железа III хлорид	ТУ 2152-003-68879995-2014 ГОСТ 4147-74	2,0
Полиэтиленгликоль-400	ТУ 2481-008-71150986-2006	74,4
Полиэтиленгликоль-1000	ТУ 2481-008-71150986-2006	18,6
Наночастицы Fe_2O_3	ГОСТ Р 57909-2017	0,01–1,0

Оборудование: Ротационный вискозиметр HAAKE Viscotester 550 (вискотестер VT 550) (фирма HAAKE, Германия), диапазон вязкости $1\text{--}10^9$ мПа · с., весы аналитические CE224-C (Сартогосм, Россия) ГОСТ Р 53228, обеспечивающие точность однократного взвешивания с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более $\pm 0,5$ мг, генератор ультразвуковой типа УЗГ-10, общей мощностью 10 кВт (Ультразвук-Резонанс, Россия), мешалка магнитная IKA C-MAG HS 7 с подогревом (фирма IKA, Германия), просвечивающий электронный микроскоп CM30 Philips CM30 (Нидерланды).

Реактивы:

Кислота Аминокaproновая (х.ч., ООО «Полисинтез», Россия), ГОСТ 7850-2013.

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

Вода очищенная, ФС.2.2.0020.15.

ПЭГ-400, ТУ 2481-008-71150986-2006.

ПЭГ-1000, ТУ 2481-008-71150986-2006.

Обработка данных производилась программным обеспечением, результаты представляются в виде графиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реологические свойства были изучены для мази, которая включала в свой состав кислоту аминокaproновую, железа III хлорид, ПЭГ-400, ПЭГ-1000, наночастицы Fe_2O_3 . Для данного исследования было изучено 4 модельных образца мазей с различным содержанием наночастиц оксида железа: 0,01%, 0,10%, 1,00% и контрольный образец. В качестве контрольного образца выступала мазь без добавления наночастиц.

Реологические исследования экспериментальных образцов проводили при комнатной температуре с помощью ротационного вискозиметра Вискотестер Haake VT550. Образец в количестве 10,0 мл помещали в камеру, затем опускали шпindel, который приводили во вращение. Измерения вязкости η (Па · с), напряжения сдвига τ (Па), скорости сдвига $\dot{\gamma}$ (с^{-1}) проводили путем увеличения числа оборотов шпинделя от 20

до 100 об/мин, достигая постоянных показателей при максимальном вращении и последующего уменьшения скорости вращения шпинделя. Встроенный микропроцессор на основе регистрируемых значений скорости вращения, крутящего момента и известной геометрии измерительной системы (системный фактор) рассчитывал вязкость в Па · с, скорость сдвига в с⁻¹ и касательное напряжение в Па.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение значения вязкости гемостатической мази

Известно, что большинство мазей и гелей под влиянием механических сил ведут себя как упругие тела, обладающие обратимой деформацией. При этом с изменением условий, в т.ч. деформирующей силы (напряжения сдвига), скорости течения (градиента скорости сдвига), температуры, степени гомогенизации и других переменных факторов, изменяется и вязкость мазей в довольно широких пределах [6].

Эффективную вязкость [7] рассчитывали по формуле:

$$\eta = \frac{R}{D_r}, \quad (1)$$

где η – эффективная вязкость, Па · с; R – касательное напряжение сдвига, Па; D_r – скорость сдвига, с⁻¹.

По рассчитанным значениям для каждого образца мази строили графики зависимости средних значений касательного напряжения сдвига и эффективной вязкости от градиента приложенной скорости, по которым судили о типе течения системы (таблица 2, рисунок 1).

Проведенные исследования зависимости величин эффективной вязкости от скорости сдвига образ-

цов показали, что вязкость резко падает с возрастанием скорости сдвига, то есть наблюдается обратно пропорциональная зависимость значений эффективной вязкости от значений скорости сдвига во всем интервале скоростей (0–300 с⁻¹).

Таблица 2. Фрагмент данных «Зависимость значений эффективной вязкости от скорости сдвига»

Table 2. Data fragment «The dependence of the effective viscosity values on the shear rate»

Скорость сдвига (1/с)	Значение эффективной вязкости (Па·с)			
	Образец 1 (0,01%*)	Образец 2 (0,10%)	Образец 3 (1,00%)	Контрольный образец
23,74	12,89	8,096	2,567	9,907
34,06	9,445	6,094	2,201	7,613
44,51	7,770	4,908	2,033	6,369
54,70	6,484	4,284	1,837	5,584
86,44	4,754	3,227	1,419	4,196
91,60	4,539	3,079	1,359	3,994
102,20	4,224	2,861	1,305	3,721
124,50	3,728	2,551	1,166	3,222
130,20	3,604	2,471	1,152	3,157
135,60	3,446	2,411	1,139	3,115
140,80	3,378	2,395	1,118	3,024
161,10	3,123	2,248	1,039	2,815
196,90	2,710	2,121	0,959	2,473
201,90	2,654	2,103	0,953	2,452
238,00	2,376	1,895	0,902	2,261
258,70	2,321	1,807	0,875	2,142
274,30	2,287	1,741	0,859	2,043
279,30	2,266	1,749	0,853	2,014
295,10	2,177	1,688	0,841	1,995
300,10	2,171	1,677	0,841	1,942

Примечание: * – указана концентрация наночастиц Fe₂O₃.

Note: * – the concentration of Fe₂O₃ nanoparticles is indicated.

Для образца № 1 (концентрация наночастиц 0,01%) и для образца № 2 (концентрация наночастиц 0,1%) вязкость резко падает в диапазоне скорости сдвига 30–100 с⁻¹, а для образца № 3 (концентрация наночастиц 1,0%) кривая вязкости почти параллельна базовой кривой, что свидетельствует о незначительном изменении показателя нелинейности. Для контрольного образца гемостатической мази кривая вязкости (базовая кривая) находится между кривыми образцов № 1 и 2. Можно сделать вывод, что системы с наночастицами с концентрацией 0,01 и 0,1% обладают лучшими вязкотекучими свойствами, это обусловлено деформационным поведением и способностью к восстановлению деформации.

Коэффициент вязкости мази с максимальной концентрацией наночастиц (1,0%) меняется с ростом скорости сдвига незначительно, т. е. для данного образца

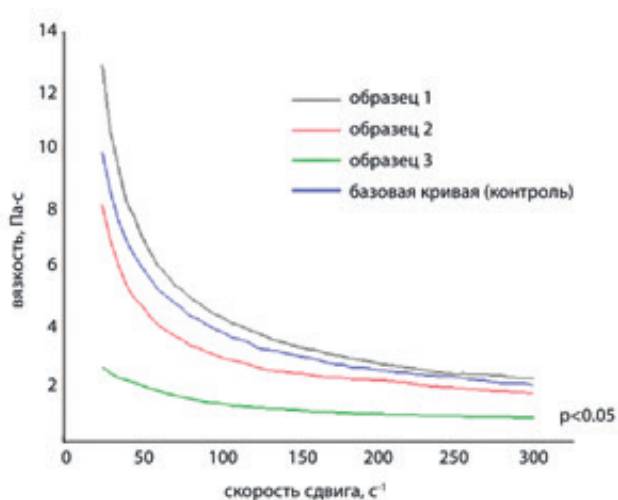


Рисунок 1. Кривые вязкости образцов гемостатической мази

Figure 1. Viscosity curves for hemostatic ointment samples

характерен ньютоновский характер течения. Реология таких систем описывается линейной функцией, что говорит о том, что исследуемый образец имеет недостаточные вязкопластичные свойства для равномерного извлечения из упаковки. Остальные образцы мази с низкими концентрациями наночастиц (0,01 и 0,1%) имели характер подобно неньютоновской жидкости. Установлено, что их реология описывается степенной моделью. Реологическое уравнение степенного закона описывается формулой:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n, \quad (2)$$

где τ – напряжение сдвига; K – коэффициент консистенции; $\dot{\gamma}$ – скорость сдвига; n – показатель степенной зависимости (показатель нелинейности).

Значение показателя n указывает на степень неньютоновского поведения жидкости в данном диапазоне скоростей сдвига. Чем меньше n , тем больше истончается жидкость под воздействием сдвига в данном диапазоне скоростей сдвига и тем менее нелинейным является график зависимости напряжения сдвига от скорости сдвига. Для мазей с низкими концентрациями наночастиц (0,01 и 0,1%) характерно вязкопластичное течение. Для всех систем существует ярко выраженный предел текучести, который соответствует 300 с^{-1} скорости сдвига.

Таким образом, установлено, что при изменении концентрации наночастиц в лекарственной форме может меняться реологическая модель. Из анализа полученных данных установлено, что добавление наночастиц существенно влияет на реологические характеристики мази.

Определение тиксотропных свойств. Построение реограмм течения

С целью изучения прочности структуры мази и определения наличия тиксотропных свойств построена тиксотропная система исследуемой основы, показывающая зависимость напряжения сдвига τ (Па) от скорости сдвига D_r (с^{-1}). Данное свойство позволяет оценить возможность мази к восстановлению структуры, что является важным при производстве и позволяет выдерживать механическое напряжение в процессе гомогенизации. Последовательность изучения тиксотропности состояла из следующих этапов: определение напряжения сдвига при минимальной скорости сдвига, что соответствует состоянию покоя; разрушение структуры образца при максимальной скорости сдвига; определение напряжения сдвига при минимальной скорости сдвига после разрушения структуры.

При исследовании графиков зависимости скорости сдвига от напряжения (рисунок 2) сдвига установлено, что реограммы течения образцов № 1 и 2 име-

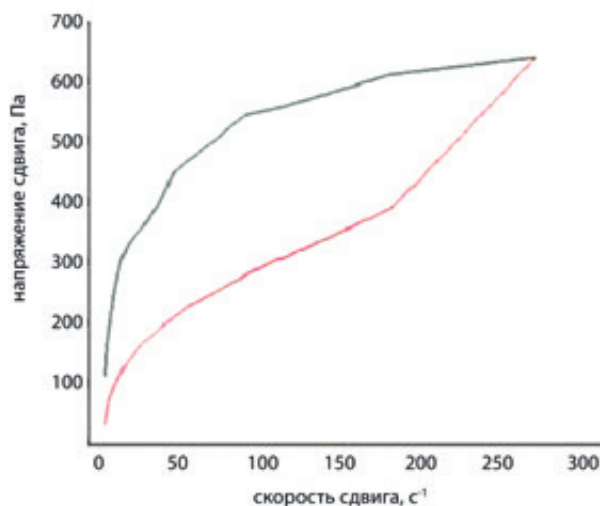


Рисунок 2. Реограмма течения образца гемостатической мази № 1

Figure 2. Rheogram of sample hemostatic ointment flow № 1

ют нелинейный характер, что свидетельствует о тиксотропных свойствах системы.

Полученные кривые образцов мази № 1 и 2 (реограммы течения) имеют нелинейный характер и описываются восходящей и нисходящей кривыми, образуя так называемую «петлю гистерезиса». Восходящая кривая показывает разрушение и устойчивость системы к приложенным нагрузкам. Мазь сохраняет остаточную деформацию после разрушения структуры под влиянием ранее приложенного напряжения. Нисходящая кривая показывает восстановление структуры образца при уменьшении воздействия [8]. На основании данного свойства можно предполагать хорошую намазываемость и способность выдавливаться из туб.

При проведении реологических исследований особый интерес представляет изменение структурно-механических свойств мазевых основ в диапазоне скоростей сдвига $3,0\text{--}5,4 \text{ с}^{-1}$, соответствующих скорости движения ладони при распределении мази по поверхности кожных покровов. Широкая петля гистерезиса может свидетельствовать о том, что лекарственная форма обладает хорошей разжижаемостью при деформации и в последующем будет обладать легкостью нанесения при втирании. По формуле 3 были рассчитаны коэффициенты динамического разжижения образцов (K_d).

$$K_d = \frac{\eta_{3,0} - \eta_{5,4}}{\eta_{3,0}} \cdot 100, \quad (3)$$

где K_d – коэффициент динамического разжижения при $D_r=3,0\text{--}5,4 \text{ с}^{-1}$, %; $\eta_{3,0}$ – эффективная вязкость при $D_r=3,0 \text{ с}^{-1}$, Па · с; $\eta_{5,4}$ – эффективная вязкость при $D_r=5,4 \text{ с}^{-1}$, Па · с.

Рассчитанные коэффициенты динамического разжижения $K_{д1}$, $K_{д2}$, $K_{д3}$ для образцов № 1, 2 и 3 составили соответственно 27,4, 21,54 и 11,7%. Это количественно подтверждает, то что при использовании образца мази № 1 (концентрация наночастиц 0,01%) будет более равномерное нанесение на поверхность кожи.

В соответствии с реограммой течения мази можно отнести к упруговязким лекарственным формам с преобладанием коагуляционных связей. Для таких систем характерно изменение формы, т. е. преобладание текучести над упруговязкими свойствами. Анализ реограмм течения показывает, что образцы мази № 1 и 2 обладают тиксотропными свойствами, что в свою очередь свидетельствует о мягкой консистенции. Таким образом, проведенные исследования показали, что образец № 1 (концентрация наночастиц Fe_2O_3 0,01%) характеризуется наилучшими реологическими свойствами.

Из проведенных исследований следует, что реологические свойства композиций с наночастицами зависят от нескольких факторов: характера основы, содержания действующих лекарственных веществ и наноконпонента. При изучении влияния концентрации наночастиц показано, что введение их в концентрации 1,00% и более ухудшает вязкотекучие свойства. Это в последующем может оказать неблагоприятные эффекты, связанные с качеством нанесения мази (удержание на поверхности и диффузии действующих веществ в поврежденной области). В тоже время образцы мази с небольшим содержанием наночастиц (с концентрацией 0,01–0,1%) вызывают особый интерес тем, что они характеризуются удовлетворительными структурно-механическими свойствами.

Разработка технологии изготовления мази с наночастицами для остановки кровотечений

На основании данных реологических исследований был выбран оптимальный состав и разработана технология мази для остановки кровотечений (таблица 3 и рисунок 3).

Таблица 3. Оптимальный состав гемостатической мази (на 100 г готового продукта)

Table 3. The optimal composition of hemostatic ointment (per 100 g of finished product)

Ингредиент	Нормативная документация	Масса, г
Кислота Аминокапроновая	ФС.2.1.0001.15, ГФ XIII изд. ГОСТ 7850-2013	5,0
Железа III хлорид	ТУ 2152-003-68879995-2014 ГОСТ 4147-74	2,0
ПЭГ-400	ТУ 2481-008-71150986-2006	74,4
ПЭГ-1000	ТУ 2481-008-71150986-2006	18,6
Наночастицы Fe_2O_3	ГОСТ Р 57909-2017	0,01

Технология изготовления мази включала следующие этапы: вспомогательные работы (санитарная подготовка производства, подготовка вспомогательных материалов и оборудования, синтез наночастиц), стадии технологического процесса (приготовление основы, получение и гомогенизация мази, контроль качества) и заключительные операции (фасовка, упаковка, маркировка).

ВР 2. Подготовка вспомогательных материалов

ВР 2.2. Подготовка действующих веществ.

Отвешивали на аналитических весах 2,00 г субстанции хлорида железа (III) и 5,00 г аминокaproновой кислоты. Исходя из растворимости субстанций, входящих в состав фармацевтической композиции, к смеси добавляли 1,0 мл. воды очищенной, смесь тщательно перемешивали.

ВР 2.3. Синтез наночастиц железа.

Наночастицы могут быть получены различными методами [9], например, низкотемпературным восстановлением водородом и методом температурной конденсации по Гену-Миллеру.

Наночастицы Fe_2O_3 , используемые в данной работе, были получены левитационно-струйным методом в среде газа-носителя (методом газозафазного синтеза) в Институте физики металлов Уральского отделения Российской академии наук. 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 [10]. По данным электронной микроскопии наночастицы имели сферическую форму и состояли из металлического сердечника и оксидной оболочки, полученной в результате контролируемого окисления при пассивации, и состоящей из магнетита Fe_2O_3 , эпитаксиально связанного с кристаллической решеткой сердечника. Средний размер частиц варьировался в зависимости от параметров процесса от 6 до 75 нм.

ТП 3. Приготовление мази

ТП 3.1. Диспергирование наночастиц в основе мази. На лабораторных весах отвешивали количество ПЭГ-400 – 74,4 г. Вносили необходимое количество наночастиц магнетита в раствор ПЭГ-400. Диспергировали смесь 3 раза по следующей схеме: в течение 30 секунд подвергали раствор ультразвуковой обработке, затем перерыв – 1 минута, при постоянном контроле экзотермического процесса (температура не должна превышать 40 °С). Более высокая температура может вызвать изменение физико-химических свойств наночастиц и изменение биологической активности препарата.

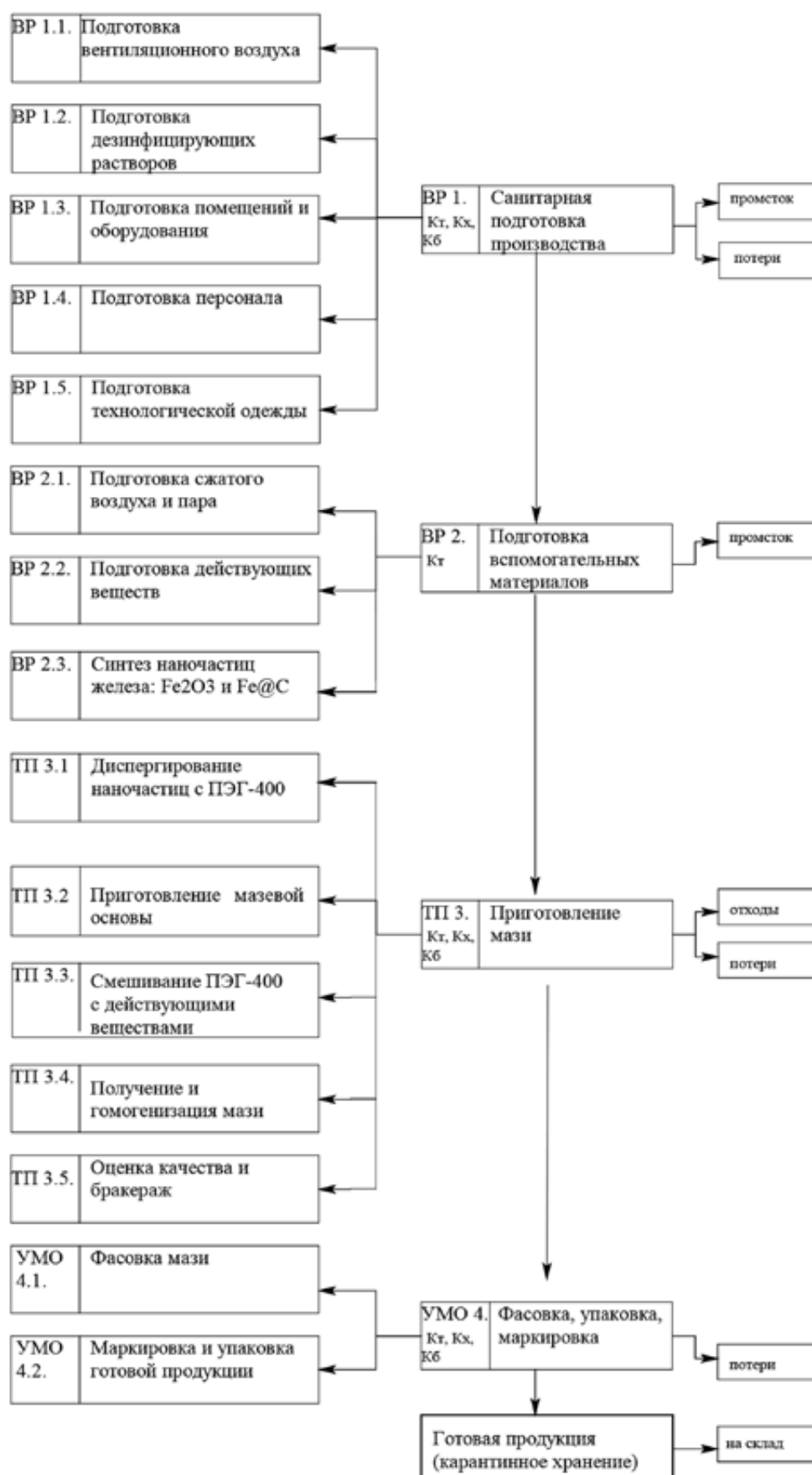


Рисунок 3. Технологическая схема производства гемостатической мази с наночастицами

Figure 3. Technological scheme of the production of hemostatic ointment with nanoparticles

ТП 3.2. Приготовление мазевой основы. На весах лабораторных отвешивали необходимые 18,6 г ПЭГ-1000. В емкость для плавления основы загружали отвешенное количество ПЭГ-1000, плавляли в течение 10 минут при температуре 65 ± 5 °C. Нагрев емкости осуществляли на бане водяной лабораторной с электрическим подогревом. Температуру в водяной бане контролировали термометром. Полноту плавления контролировали визуально по отсутствию нерасплавленных кусков.

ТП 3.3. Смешивание ПЭГ-400 и наночастиц магнетита с действующими веществами. К смеси ПЭГ-400 с наночастицами железа вносили раствор, содержащий аминокaproновую кислоту и хлорид железа (III). Перемешивали до однородной консистенции.

ТП 3.4. Получение и гомогенизация мази. Охлажденную основу до 40–45 °C смешивали со смесью действующих веществ и наночастиц магнетита. В целях лучшей степени гомогенизации смесь обрабатывали ультразвуком в течение 2 минут [11]. Контроль равномерного распределения действующих веществ в расплавленном концентрате осуществляли визуально по достижению однородной окраски основы.

Готовая лекарственная форма представляла собой густую, однородную массу от темно-коричневого до черного цвета со специфическим запахом. Упаковывали в алюминиевую трубу (ГОСТ 17768-90).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение статьи необходимо отметить:

1. Установлено уменьшение вязкости образцов мази при увеличении скорости сдвига. Данная зависимость характерна для систем с пластическим типом течения и характеризует исследуемые образцы как структурированную дисперсную систему.
2. Исследуемые образцы мази № 1 и 2 (концентрация наночастиц 0,01 и 0,1%) обладали удовлетворительной степенью намазываемости и экструзии из туб.
3. Рассчитанные коэффициенты динамического разжижения K_{d1} , K_{d2} , K_{d3} для образцов № 1, 2 и 3 составили соответственно 27,4, 21,54 и 11,7%, что количественно подтверждает более равномерное нанесение на кожу при применении образцов мазей № 1 и 2.
4. Лучшими реологическими свойствами обладал образец № 1 с концентрацией наночастиц 0,01%.
5. Предложена технология получения и технологическая схема производства гемостатической мази с наночастицами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсукова Ю. Н., Мельникова О. А. Состояние фармацевтического рынка гемостатических лекарственных препаратов Российской Федерации. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, биология, фармация.* 2017; 1: 138–142.
2. Хаджиева З. Д., Зилфикаров И. Н., Теунова Е. А. Определение реологических показателей и создание технологической схе-

мы производства олеогеля. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация.* 2010; 22 (93): 58–65.

3. Jensen M. K., Rasmussen H. K., Skov A. L. et al. *Rheol. Acta.* 2011; 50: 729. <https://doi.org/10.1007/s00397-011-0552-3>.
4. Guinn L. & Doctor V. M. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2003; 28: 315. <https://doi.org/10.1007/BF03220185>.
5. Sanvicens N., Marco M. P. Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology.* 2008; 26: 8. 433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
6. Тенцова А. И., Грецкий В. М. Современные аспекты исследования и производства мазей. М.: Медицина. 1980; 192.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. М., 2018; 1: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/
8. Brazdar L. Structural and rheological properties of collagen hydrogels containing tannic acid and chlorhexidine digluconate intended for topical applications. *Comptes Rendus Chimie.* 2015; 18(2): 9–16. DOI: 10.1016/crci.2014.07.007.
9. Tavakoli A., Sohrabi M., Kargari A. A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chemical Papers.* 2007; 61(3): 151–170. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11696-007-0014-7>.
10. Tsurin V. A. et al. Synthesis, structure, and magnetic properties of iron and nickel nanoparticles encapsulated into carbon. *Physics of the Solid State.* 2014; 55(2): 287–301. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1063783414020309>.
11. Cavegn M. et al. Study of an ultrasound-based process analytical tool for homogenization of nanoparticulate pharmaceutical vehicles. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2011; 100(8): 3374–3385. DOI: 10.1002/jps.22538.

REFERENCES

1. Barsukova Yu. N., Melnikova O. A. The state of the pharmaceutical market for hemostatic drugs of the Russian Federation. *Bulletin of the Voronezh State University. Chemistry, biology, pharmacy;* 2017; 1: 138–142. (In Russ.).
2. Khadzheva Z. D., Zilfikarov I. N., Teunova E. A. Determination of rheological parameters and creation of a technological scheme for the production of oleogel. *Scientific statements of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacy.* 2010; 22 (93): 58–65. (In Russ.).
3. Jensen M. K., Rasmussen H. K., Skov A. L. et al. *Rheol. Acta.* 2011; 50: 729. <https://doi.org/10.1007/s00397-011-0552-3>.
4. Guinn L. & Doctor V. M. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 2003; 28: 315. <https://doi.org/10.1007/BF03220185>.
5. Sanvicens N., Marco M. P. Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology.* 2008; 26: 8. 433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
6. Tentsova A. I., Gretskey V. M. Modern aspects of research and production of ointments. M.: Medicine. 1980; 192. (In Russ.).
7. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 1: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (in Russ.).
8. Brazdar L. Structural and rheological properties of collagen hydrogels containing tannic acid and chlorhexidine digluconate intended for topical applications. *Comptes Rendus Chimie.* 2015; 18(2): 9–16. DOI: 10.1016/crci.2014.07.007.
9. Tavakoli A., Sohrabi M., Kargari A. A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chemical Papers.* 2007; 61(3): 151–170. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11696-007-0014-7>.
10. Tsurin V. A., et al. Synthesis, structure, and magnetic properties of iron and nickel nanoparticles encapsulated into carbon. *Physics of the Solid State.* 2014; 55(2): 287–301. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1063783414020309>.
11. Cavegn M. et al. Study of an ultrasound-based process analytical tool for homogenization of nanoparticulate pharmaceutical vehicles. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2011; 100(8): 3374–3385. DOI: 10.1002/jps.22538.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-55-64
УДК 661.12.011: [615.454.1: 615.276].074

Влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей

Н. А. Ляпунов^{1*}, И. А. Зинченко¹, Е. П. Безуглая¹, А. А. Лысокобылка¹

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

*Контактное лицо: Ляпунов Николай Александрович. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Статья получена: 24.03.2019. Статья принята к печати: 24.04.2019

Резюме

Введение. Рациональной является фиксированная комбинация кетопрофена, метилсалицилата и L-ментола в форме крем-геля. Кетопрофен образует соли с основаниями и сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы. Кетопрофен практически нерастворим в воде, а растворимость солей кетопрофена намного выше, что может привести к его различной локализации в эмульсии м/в и повлиять на профиль примесей кетопрофена, образующихся при этерификации.

Цель. Цель работы – исследовать влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей в процессе хранения.

Материалы и методы. Исследовали крем-гели, содержащие 2,5% кетопрофена, 5% L-ментола и 10% метилсалицилата с pH 5,5 или pH 6,8, при изготовлении которых кетопрофен растворяли в смеси L-ментол – метилсалицилат или смешанном растворителе вода – пропиленгликоль (ПГ) – диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (ДГМЭ). Методом жидкостной хроматографии проводили идентификацию примесей, а также определяли распределение кетопрофена между фазами эмульсии и содержание примесей в крем-гелях. Реологические свойства крем-гелей исследованы методом ротационной вискозиметрии, а их микроструктура – методом оптической микроскопии.

Результаты и обсуждение. Исследовано образование сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом в крем-гелях. Показаны различия в локализации кетопрофена в фазах эмульсии м/в при pH 5,5 и pH 6,8. Образующиеся примеси идентифицированы по временам удерживания их пиков на хроматограммах, УФ спектрам и масс-спектрам. Установлено, что при хранении содержание сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом возрастает; скорость их образования оказывается меньше при pH=6,8 и введении кетопрофена в виде соли с триметамолом в дисперсионную среду крем-геля. Однако при этом образуются три примеси, которые по УФ спектрам идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата. При хранении крем-гелей с pH=6,8 возрастает содержание продуктов разложения метилсалицилата, которые не обнаружены при pH=5,5.

Заключение. При изготовлении крем-геля кетопрофен целесообразно растворять в смеси метилсалицилата с L-ментолом и нормировать pH на уровне 5,5. В качестве усилителей проникновения рационально использовать гидрофильные растворители без гидроксильных групп, что ограничит профиль примесей ментоловыми эфирами энантиомеров кетопрофена.

Ключевые слова: кетопрофен, метилсалицилат, L-ментол, крем-гель, эмульсия м/в, гидрофильный растворитель, сложный эфир, примесь, хроматограмма, спектр.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Ляпунов Н. А., Зинченко И. А., Безуглая Е. П., Лысокобылка А. А. Влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 55–64.

Effect of the Ketoprofen Distribution in Cream-gels on the Formation of the Impurities

N. A. Lyapunov^{1*}, I. A. Zinchenko¹, E. P. Bezuglaya¹, A. A. Lysokobilka¹

¹ – State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of the National Academy of Sciences of Ukraine, 60, Nauki av., Kharkiv, 61072, Ukraine

*Corresponding author: Nikolay A. Lyapunov. E-mail: lyapunov.na@gmail.com

Received: 24.03.2019. Accepted: 24.04.2019

Abstract

Introduction. The fixed combination of ketoprofen, methyl salicylate and levomenthol in the form of a cream-gel is rational. Ketoprofen forms salts with bases and esters with substances containing hydroxyl groups. Ketoprofen is practically insoluble in water, and the solubility of ketoprofen salts is much higher; this can lead to its different localization in the o/w emulsion and affect the profile of ketoprofen impurities resulting from esterification.

Aim. The aim of the work is to study the effect of ketoprofen distribution in cream-gels on the formation of the impurities during storage.

Materials and methods. Cream-gels with pH of 5,5 or 6,8 containing ketoprofen 2,5%, levomenthol 5% and methyl salicylate 10% have been studied. For their production, ketoprofen was dissolved in the mixture of levomenthol – methyl salicylate or in the mixed solvent of water – propylene glycol (PG) – diethylene glycol monoethyl ether (DGME). The impurities have been identified by liquid chromatography and the distribution of ketoprofen between the phases of the emulsion and the content of impurities in cream-gels have been determined by the same method. The rheological characteristics of cream-gels have been studied by viscosity-rotating viscometer method, and their microstructure – by optical microscopy.

Results and their discussion. The formation of ketoprofen esters with PG, DGME and levomenthol in cream-gels have been studied. Differences in the localization of ketoprofen in the phases of the o/w emulsion at pH 5,5 and 6,8 have been shown. The formed impurities have been identified by the retention times of their peaks on chromatograms, by UV spectra and mass spectra. It has been established that during storage the content of ketoprofen esters with PG, DGME and levomenthol increased, but their formation rate was lower at pH=6,8 as well as at the adding of ketoprofen as a salt with trometamol into the dispersion medium of cream-gel. However, this resulted in formation of three impurities that were identified by UV spectra as decomposition products of methyl salicylate. When storing cream-gels with pH=6,8, the content of decomposition products of methyl salicylate, which were not detected at pH=5,5, increased.

Conclusion. When making a cream-gel, ketoprofen is advisable to dissolve in a mixture of methyl salicylate and levomenthol and standardize the pH about 5,5. It is rational to use hydrophilic solvents without hydroxyl groups as penetration enhancers and the impurity profile could be limited to the menthol esters of the enantiomers of ketoprofen as a result.

Keywords: ketoprofen, methyl salicylate, levomenthol, cream-gel, o/w emulsion, hydrophilic solvent, ester, impurity, chromatogram, spectrum.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Lyapunov N. A., Zinchenko I. A., Bezuglaya E. P., Lysokobilka A. A. Effect of the ketoprofen distribution in cream-gels on the formation of the impurities. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 55–64.

ВВЕДЕНИЕ

При боли в суставах и мышцах для местного лечения широко применяют гели кетопрофена, оказывающие противовоспалительное и анальгетическое действие [1, 2]. Для этих целей применяют мази и кремы с метилсалицилатом и ментолом [1, 2], а также крем-гели, содержащие метилсалицилат и ментол в комбинации с диклофенака диэтиламинол или нимесулидом [2]. Рациональной является фиксированная комбинация кетопрофена, метилсалицилата и L-ментола в форме крем-геля. При скрининговых исследованиях на модели каррагенинового отёка лапы у крыс [3] показано, что противовоспалительный и анальгетический эффекты геля кетопрофена 2,5% составили соответственно $37,7 \pm 1,6\%$ и $30,1 \pm 3,4\%$, а крем-геля, содержащего 2,5% кетопрофена, 10% метилсалицилата и 5% L-ментола, – $63,6 \pm 3,2\%$ и $56,2 \pm 2,7\%$.

Кетопрофен представляет собой (2RS)-2-(3-бензоилфенил) пропановую кислоту и образует соли с органическими и неорганическими основаниями, а также сложные эфиры с веществами, содержащими гидроксильные группы. Кетопрофен практически нерастворим в воде [4], но растворимость солей кетопрофена с органическими основаниями в воде и смешанных растворителях *вода – этанол* оказывается намного выше, что и обуславливает составы вспомогательных веществ в гелях кетопрофена [2]. Различие в растворимости кетопрофена и солей кетопрофена может привести к его различной локализации в дисперсионной среде и дисперсной фазе крем-геля. Это, в свою очередь, может повлиять на профиль примесей кетопрофена, образующихся при хранении препарата вследствие реакции этерификации.

Цель работы – исследовать влияние распределения кетопрофена в крем-гелях на образование примесей в процессе хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали субстанции: кетопрофен («Societa Italiana Medicinali Scandic», Италия; серия 168.718, изготовлен 06.2012, дата повторного контроля 06.2017), метилсалицилат («Novacyl», Франция; серия FMS1215111, изготовлен 30.05.2012, дата повторного контроля 30.05.2017) и L-ментол («Xiangsheng Perfume (Huaian) Co, Ltd», Китай; серия 170314, изготовлен 24.03.2017, годен до 23.03.2020) [4]. Крем-гели имели следующий состав (г/100 г): кетопрофен 2,5, метилсалицилат 10,0, L-ментол 5,0, карбомер 1,5, трометамол q. s. (до требуемого pH), эмульгатор м/в 4,5, диэтиленгликоля моноэтиловый эфир (ДГМЭ) 5,0, пропиленгликоль (ПГ) 10,0, вода очищенная до 100,0. Лекарственные и вспомогательные вещества соответствовали требованиям Европейской Фармакопеи [4]. В состав крем-гелей были введены два гидрофильных неводных растворителя ДГМЭ и ПГ, содержащие

в молекулах, соответственно, одну и две гидроксильные группы и образующие с кетопрофеном в растворах сложные эфиры [5, 6].

Исследование распределения кетопрофена в эмульсиях проводили следующим образом. В три делительные воронки помещали растворы А и Б следующих составов (в граммах):

1 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0; **раствор Б** – кетопрофен 2,5 + ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + трометамол 2,94 + вода 60,25;

2 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0 + кетопрофен 2,5; **раствор Б** – ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + вода 60,25;

3 воронка: раствор А – метилсалицилат 10,0 + L-ментол 5,0 + кетопрофен 2,5; **раствор Б** – ПГ 10,0 + ДГМЭ 5,0 + трометамол 2,94 + вода 60,25.

Эмульгировали раствор А в растворе Б путём взбалтывания; эмульсию выдерживали в делительной воронке в течение 3 суток до разделения фаз. Отбирали пробы из верхнего и нижнего слоя, центрифугировали их в течение 10 мин с частотой вращения 15000 об/мин и готовили испытуемые растворы:

- 1,0 мл гидрофобной фазы в мерной колбе вместимостью 50 мл растворяли в 40 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали;
- 1,0 мл гидрофильной фазы в мерной колбе вместимостью 50 мл растворяли в 40 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. 2,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали.

Содержание кетопрофена в растворах определяли методом жидкостной хроматографии [4] по вализированной методике [7] с использованием хроматографа модели LC-2010CHT Prominence-i («Shimadzu», Япония) в следующих условиях: колонка Inertsil ODS-2 размером 250×4,6 мм (размер частиц 5 мкм); подвижная фаза – *фосфатный буферный раствор pH 2,5 и ацетонитрил (50:50)*; скорость потока 1,5 мл/мин; температура колонки 40 °C; температура автоинжектора 25 °C; детектор – спектрофотометрический, детектирование при длине волны 255 нм; объём вводимой пробы 10 мкл; время хроматографирования 15 мин.

Для приготовления *раствора сравнения* 25,36 мг стандартного образца (СО) кетопрофена BP CRS (Ketoprofen BP CRS, кат. № 668) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл метанола, доводили объём раствора метанолом до метки и перемешивали. На рисунке 1 представлены репрезентативные хроматограммы испытуемых растворов и раствора сравнения.

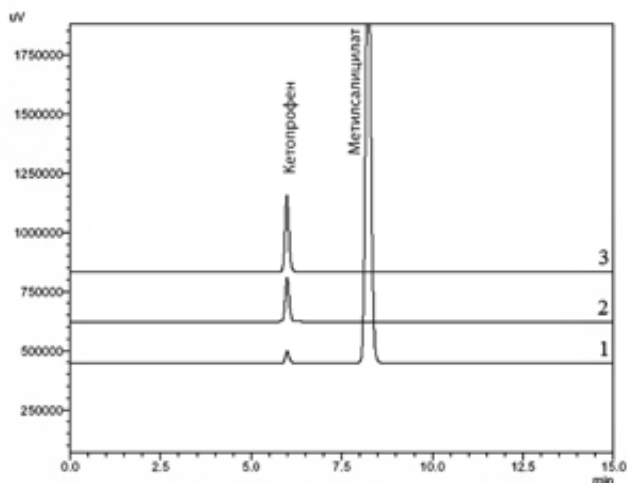


Рисунок 1. Хроматограммы раствора кетопрофена в гидрофобной фазе (1), раствора кетопрофена в гидрофильной фазе (2) и раствора сравнения (3)

Figure 1. Chromatograms of ketoprofen solution in hydrophobic phase (1), ketoprofen solution in hydrophilic phase (2) and reference solution (3)

Крем-гели готовили двумя способами:

Способ 1. В метилсалицилате при перемешивании растворяли L-ментол и затем кетопрофен; смешивали раствор с эмульгатором. В воде диспергировали карбомер до получения однородной дисперсии, которую смешивали с ПГ и ДГМЭ. В дисперсию вводили раствор кетопрофена и L-ментола в метилсалицилате и эмульгировали, после чего при перемешивании массы карбомер нейтрализовали водным раствором триметамола до pH крем-геля 5,5.

Способ 2. В метилсалицилате при перемешивании растворяли L-ментол и смешивали раствор с эмульгатором. В воде диспергировали карбомер до получения однородной дисперсии, которую смешивали с водным раствором триметамола до pH геля 5,5. В смеси ПГ и ДГМЭ при перемешивании растворяли кетопрофен и раствор смешивали с водным раствором триметамола, который брали в эквимолярном количестве по отношению к кетопрофену с избытком 5%. Гель смешивали с раствором кетопрофена, вводили раствор L-ментола в метилсалицилате и эмульгировали до образования крем-геля, довели pH до 6,8.

Для изготовления крем-гелей использовали вакуумный реактор-гомогенизатор РП-5 («Промвит», Украина). Для предотвращения образования газовой эмульсии процессы диспергирования, перемешивания и эмульгирования вели под вакуумом глубиной от –0,05 МПа до –0,07 МПа.

Микроструктуру гелей и крем-гелей определяли методом оптической микроскопии [4] с помощью микроскопа с окуляр-микрометром «Krüss MBL 2100» («A. Krüss Optronic», Германия). pH измеряли потенциометрически [4] непосредственно в гелях и крем-гелях pH-метром «Metrohm 827 lab» («Metrohm AG, Швейца-

рия») с электродом типа «Porotrode» (кат. № 6.0235.100). Реологические исследования проводили методом ротационной вискозиметрии на реовискозиметре с коаксиальными цилиндрами «Rheolab QC» («Anton Paar», Австрия) [4]. Для определения структурной вязкости крем-гелей в зависимости от pH по способу 1 были изготовлены лабораторные образцы крем-гелей с pH от 4,5 до 6,8.

Для определения эфиров кетопрофена навески крем-гелей (1,5 г) растворяли в 50 мл метанола и центрифугировали в течение 10 мин с частотой вращения 12000 об/мин. Испытуемым раствором служила прозрачная жидкость над осадком. Испытуемые растворы и раствор сравнения готовили массо-объемным способом. Навески взвешивали на аналитических весах AUW-120 D («Shimadzu», Япония). Растворы хроматографировали на жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D («Shimadzu», Япония) в следующих условиях: хроматографическая колонка Discovery® RP Amide C16 размером 250×4,6 мм (размер частиц 5 мкм); подвижная фаза А (ПФ А) – фосфатный буферный раствор pH 5,9 и ацетонитрил (70:30); подвижная фаза В (ПФ В) – фосфатный буферный раствор pH 5,9 и ацетонитрил (30:70); состав подвижной фазы программируется: от (0–4) мин ПФ А составляет 100%, ПФ В – 0%, (4–15) мин ПФ А (100→0) %, ПФ В (0→100) %, (15–35) мин ПФ А – 0%, ПФ В – 100%, (35–39) мин ПФ А (0→100) %, ПФ В (100→0) %, (39–42) мин ПФ А 100%, ПФ В 0%; скорость потока 1,5 мл/мин; температура колонки 40 °С; температура автоинжектора 25 °С; детектор – диодно-матричный в диапазоне от 200 нм до 400 нм, детектирование при $\lambda=255$ нм; объем вводимой пробы 10 мкл; время хроматографирования 42 мин. При хроматографировании снимали УФ спектры поглощения.

Для приготовления раствора сравнения 15,0 мг СО кетопрофена BP CRS помещали в мерную колбу темного стекла вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл метанола, довели объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу темного стекла вместимостью 25 мл, довели объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Количественное содержание эфиров кетопрофена рассчитывали по кетопрофену с учетом коэффициентов пересчета по молекулярной массе [6].

В таблицах 1 и 2 и на рисунках 2 и 3, представлены результаты валидации методики количественного определения примесей кетопрофена. Диапазон её применения обусловлен тем, что в гелях кетопрофена допускается содержание кетопрофена этилового эфира $\leq 4,0\%$ по спецификации в течение срока хранения и $\leq 0,2\%$ (предельное определение) по спецификации при выпуске. Методика характеризуется достаточной сходимостью и правильностью (таблица 1) [8].

Подтверждена линейность методики в диапазоне её применения (рисунок 2, таблица 2).

Таблица 1. Результаты анализов модельных смесей, содержащих от 5 до 125% кетопрофена по отношению к предельно допустимому содержанию примеси его эфира, их статистическая обработка и оценка

Table 1. The results of analyzes of model mixtures containing from 5 to 125% ketoprofen in relation to the acceptable limit of the impurity (its ester), their statistical processing and evaluation

№	Введено в % от номинальной концентрации (Xi, факт., %)	Найдено в % от номинальной концентрации (Yi, %)	Найдено в % к введённому Zi=100 · (Yi/Xi)
1	5,00	5,18	103,52
2	10,01	9,90	98,95
3	15,01	15,28	101,80
4	20,01	20,36	101,73
5	25,02	25,45	101,72
6	30,02	29,91	99,65
7	40,03	39,67	99,11
8	50,03	50,83	101,59
9	60,04	59,37	98,89
10	70,05	70,09	100,06
11	80,05	81,73	102,09
12	90,06	90,46	100,45
13	95,06	95,01	99,94
14	100,07	99,15	99,09
15	105,07	104,37	99,34
16	110,07	111,85	101,62
17	115,08	115,34	100,23
18	125,08	124,29	99,36
Среднее (Z_{cp})			100,51%
Относительное стандартное отклонение (RSD_z)			1,3573%
Относительный доверительный интервал (Δ_z) $\Delta_z = t(95\%, 18 - 1) \cdot RSD_z = 1,7396 \cdot 1,3573\%$			2,3611%
Критическое значение для сходимости результатов (Δ_{As})			5,0%
Оценка сходимости:			$2,3611 < 5,0\%$
Систематическая ошибка $\delta \% = Z_{cp} - 100 $			0,51%
Критерий статистической незначимости систематической ошибки:			
$\delta < \Delta_z : \sqrt{18} = 2,3611\% : 4,24 = 0,56\%$			0,56%
Оценка правильности по критерию статистической незначимости:			$0,56 > 0,51\%$
Критерий практической незначимости систематической ошибки: $\delta \leq \max \delta = 0,32 \times 5,0\% = 1,6\%$			1,6%
Оценка правильности по критерию практической незначимости:			$1,6 > 0,51\%$
Общий вывод о методике:			корректна

Специфичность методики проиллюстрирована на рисунке 3. По сравнению с хроматограммой растворителя (1) на хроматограммах испытуемых растворов крем-гелей 3 и 4, которые хранились 3 месяца при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, дополнительно присутствуют пики кетопрофена ($Rt \approx 4,3$ мин) и метилсалицилата ($Rt \approx 10,5$ мин). На хроматограмме 3 дополнительно обнаружены пики с $Rt \approx 11,6$ мин, $Rt \approx 14,3$ мин и двойной

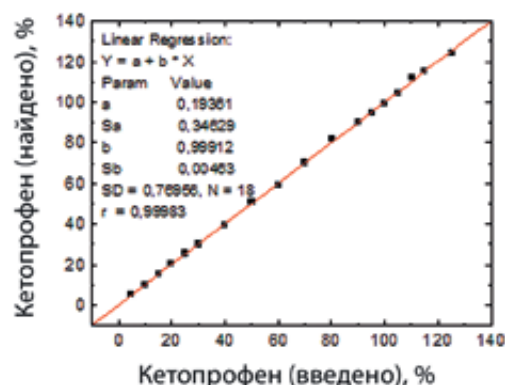


Рисунок 2. Линейная зависимость найденной концентрации кетопрофена от его введённой концентрации в нормализованных координатах

Figure 2. Linear relationship of the determined concentration of ketoprofen on its introduced concentration in normalized coordinates

пик с $Rt \approx 26,4$ мин и $Rt \approx 26,9$ мин, а на хроматограмме 4 – пики с $Rt \approx 6,8$ мин, $Rt \approx 7,4$ мин и $Rt \approx 10,1$ мин. Пики разных веществ разделяются и имеют разные времена удерживания (Rt). Дополнительные пики на хроматограмме 3 имеют характерный для кетопрофена УФ спектр с максимумом поглощения при $\lambda = 255$ нм (рисунок 4); пик с $Rt \approx 11,6$ мин идентифицирован как пик кетопрофена ПГ эфира, а пик с $Rt \approx 14,3$ мин – как пик кетопрофена ДГМЭ эфира (см. хроматограммы 3 и 5 на рисунке 3). Для идентификации использовали вещества сравнения: кетопрофена ПГ эфир и кетопрофена ДГМЭ эфир, идентифицированные ранее по УФ спектрам и масс-спектрам [5, 6]. Дополнительные пики на

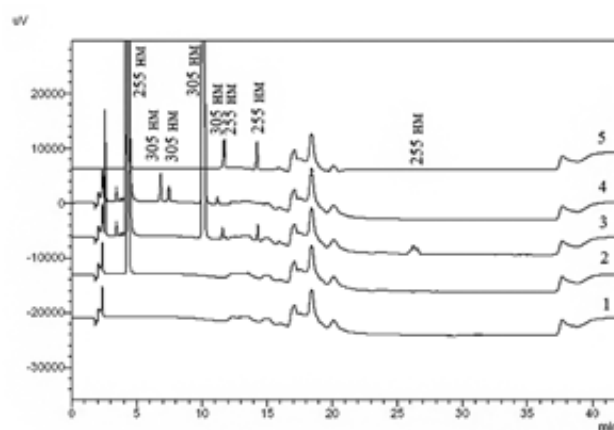


Рисунок 3. Хроматограммы растворителя (1); раствора сравнения кетопрофена (2); растворов крем-гелей, изготовленных по способу 1 (3) и способу 2 (4) после 3 месяцев хранения при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; раствора кетопрофена ПГ эфира и кетопрофена ДГМЭ эфира (5). Значения Rt см. в тексте

Figure 3. Chromatograms of the solvent (1); ketoprofen reference solution (2); solutions of cream-gels produced according to method 1 (3) and method 2 (4) after 3-month storage at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$; solution of ketoprofen PG ester and ketoprofen DGME ester (5). Rt values, see text

хроматограмме 4 имеют УФ спектр с максимумом поглощения при $\lambda=305$ нм, характерный для метилсалицилата (рисунок 5), и идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата.

Таблица 2. Оценка метрологических характеристик линейной зависимости

Table 2. Evaluation of metrological characteristics of linear relationship

Параметры	Значения	Критерии приемлемости и оценка	Вывод
b	0,99912		
S_b	0,00463		
α	0,19361	$\alpha \leq \Delta_{\alpha} = t(95\%, n-2) \cdot S_{\alpha}$ $0,19361 < 1,7459 \cdot S_{\alpha} =$ $= 0,61 $	соответствует
S_{α}	0,34629		
SD_0	0,76956%		
SD_0/b	0,77024%	$SD/b \leq \Delta_{AS} : t(95\%, n-2)$ $0,77024 < 5\% : 1,7459 =$ $= 2,86\%$	соответствует
r	0,99983	$0,99983 > 0,99898 $	соответствует

Для идентификации примесей кетопрофена с $Rt \approx 26,4$ – $26,9$ мин был определён их масс-спектр с использованием хроматографа «Agilent 1260» и колонки Inertsil ODS-2 размером $150 \times 4,6$ мм (размер частиц 5 мкм) с предколонкой Inertsil ODS-2 размером $10 \times 4,6$ мм (размер частиц 5 мкм). Компоненты подвижной фазы: А – раствор кислоты муравьиной с $pH=2,7$ и В – ацетонитрил (30:70); скорость потока элюента 1 мл/мин; деление потока 1:1; объём инъекции 5 мкл; температура термостата инжектора 8 °С; температура

термостата колонки 35 °С. Параметры детектирования: детектор MS/MS «Agilent 6420 Triple Quad»; источник ионизации ESI (электроспрей); температура газа 350 °С; поток газа 8 л/мин; давление 40 psi; напряжение 4000 V; режим сбора данных: сканирование в диапазоне масс 120–600 а.е.м.; время начала сбора данных 0 мин; продолжительность сбора данных 40 мин; MS2 from 120 m/z; MS2 to 600 m/z; scan time 500 msec; fragmentor 120 V; cell accelerator voltage 7 ΔV ; polarity – positive.

Содержание примесей метилсалицилата (X), в процентах, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_i}{S_{ms} + \sum S_i} \cdot 100,$$

где S_i – площадь пика примеси метилсалицилата, $\sum S_i$ – сумма площадей пиков примесей метилсалицилата, S_{ms} – площадь пика метилсалицилата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для идентификации примесей кетопрофена с $Rt \approx 26,4$ – $26,9$ мин (см. хроматограмму 3 на рисунке 3) была получена хроматограмма по методике, позволяющей снять масс-спектр на хроматографе с масс-детектором (рисунок 6).

На хроматограмме (рисунок 6) наблюдается двойной пик с $Rt=36,879$ мин и $Rt=38,329$ мин. Масс-спектры, полученные для первой и второй части пика, являются идентичными (рисунок 7). Основным ион в масс-спектрах хроматографических пиков с $Rt=36,879$ мин и с $Rt=38,329$ мин имеет значение m/z 391,20 что соответствует молекулярному иону $[M + H]^+$ примеси кетопрофена $C_{26}H_{32}O_3$ (М. м. 392 а.е.м.), ион с соотношением m/z 410,20 является ионным аддуктом данной примеси и натрия $[M + Na]^+$, а ион с соотноше-

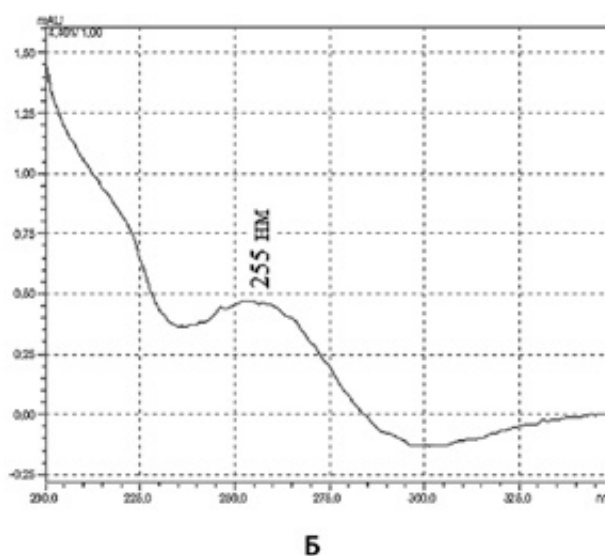
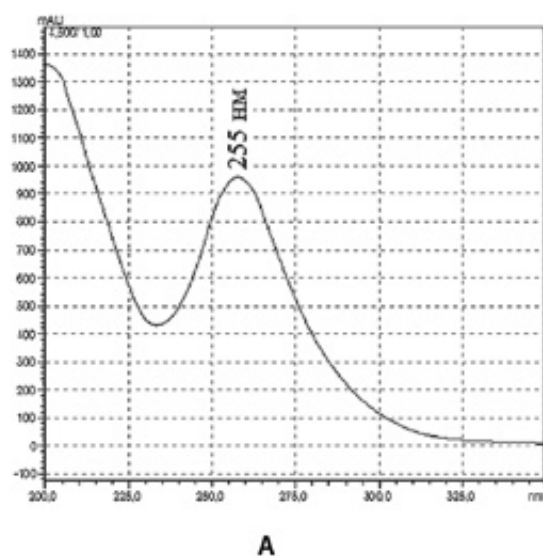


Рисунок 4. Репрезентативные УФ-спектры пиков: А – кетопрофена (рисунок 3, хроматограмма 3, $Rt \approx 4,3$ мин); Б – примеси кетопрофена (рисунок 3, хроматограмма 3, $Rt \approx 26,4$ мин)

Figure 4. Representative UV spectra of peaks: А – ketoprofen (Figure 3, chromatogram 3, $Rt \approx 4,3$ min); Б – impurity of ketoprofen (Figure 3, chromatogram 3, $Rt \approx 26,4$ min)

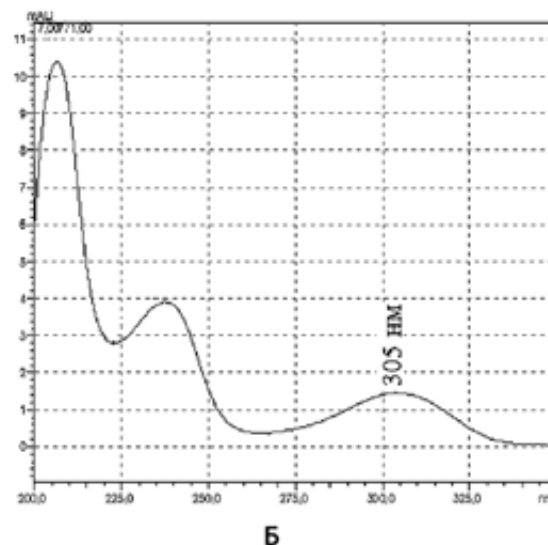
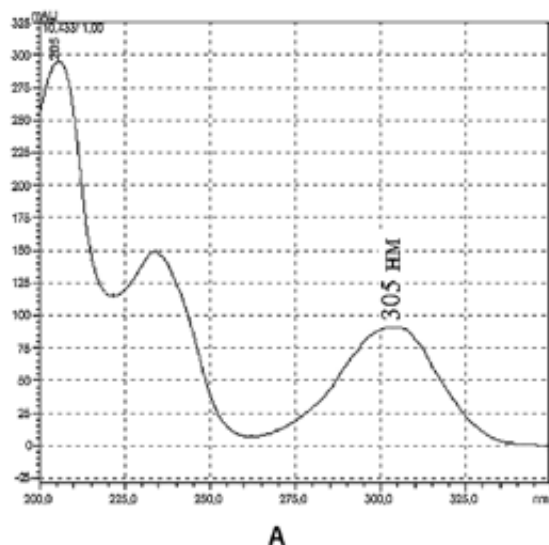


Рисунок 5. Репрезентативные УФ-спектры пиков: А – метилсалицилата (рисунок 3, хроматограмма 4, $R_t \approx 10,5$ мин); Б – примеси метилсалицилата (рисунок 3, хроматограмма 4, $R_t \approx 6,8$ мин)

Figure 5. Representative UV spectra of peaks: А – methyl salicylate (Figure 3, chromatogram 4, $R_t \approx 10,5$ min); Б – methyl salicylate impurities (Figure 3, chromatogram 4, $R_t \approx 6,8$ min)

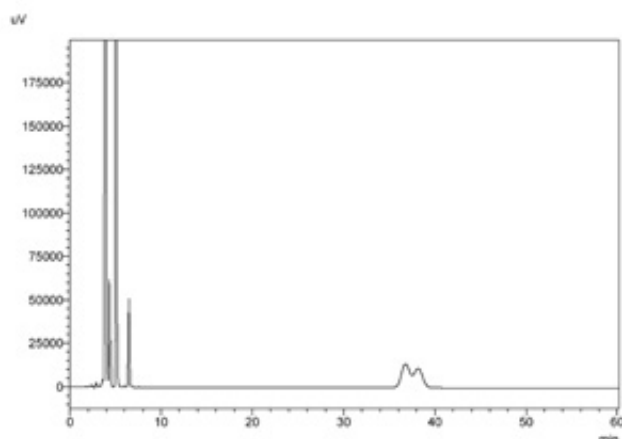


Рисунок 6. Хроматограмма раствора крем-геля, изготовленного по способу 1, после 5 лет хранения, где пики с $R_t=36,879$ мин и $R_t=38,329$ мин соответствуют сложным эфирам кетопрофена и L-ментола

Figure 6. Chromatogram of solution of the cream-gel prepared according to method 1 after 5-year storage, where peaks with $R_t=36,879$ min and $R_t=38,329$ min correspond to esters of ketoprofen and levomenthol

нием m/z 431,00 является ионным аддуктом данной примеси и калия $[M + K]^+$. Таким образом, хроматографические пики с $R_t=36,879$ мин и с $R_t=38,329$ мин принадлежат примеси кетопрофена с формулой $C_{26}H_{32}O_3$ (М. м. 392 а.е.м.), то есть, L-ментоловому эфиру кетопрофена. Раздвоение пика, видимо, обусловлено образованием эфиров L-ментола с разными энантиомерами кетопрофена.

Крем-гели, изготовленные двумя способами, имеют идентичную микроструктуру и являются эмульсиями м/в (рисунок 8), в которых однородно распределе-

ны частицы дисперсной фазы и отсутствуют кристаллы кетопрофена.

Крем-гели имеют пластический тип течения (рисунок 9); их структурная вязкость проходит через максимум при $pH=5,5$ (рисунок 10). Поэтому реологические параметры геля с $pH=5,5$, изготовленного по способу 1, несколько больше, чем у геля с $pH=6,8$, изготовленного по способу 2 (рисунок 9).

При pH геля 5,5 трометамол полностью или преимущественно расходуется на нейтрализацию карбомера. Если в гель с $pH=5,5$ ввести раствор, содержащий 2,5 г кетопрофена, 5,0 г ДГМЭ и 10,0 г ПГ, то кетопрофен кристаллизуется (рисунок 11А). В геле с $pH=6,0$ кетопрофен в виде соли растворён в гидрофильной среде (рисунок 11Б). Т. е., при $pH \leq 5,5$ создаются условия для локализации кетопрофена в гидрофобной фазе, а при $pH \geq 6,0$ – в гидрофильной среде.

В таблице 3 представлены результаты исследования распределения кетопрофена между гидрофильной средой и гидрофобной фазой эмульсий.

Таблица 3. Распределение кетопрофена в эмульсиях

Table 3. Distribution of ketoprofen in emulsions

Номер делительной воронки	pH эмульсии	Количество кетопрофена в гидрофильной среде, в процентах от 2,5 г	Количество кетопрофена в гидрофобной фазе, в процентах от 2,5 г
1	7,25	92,30	7,70
2	3,81	0,85	99,15
3	7,30	90,53	9,47

Как следует из таблицы 3, при отсутствии трометамола, необходимого для нейтрализации кетопрофена, в гидрофильной среде растворилось всего 0,021 г

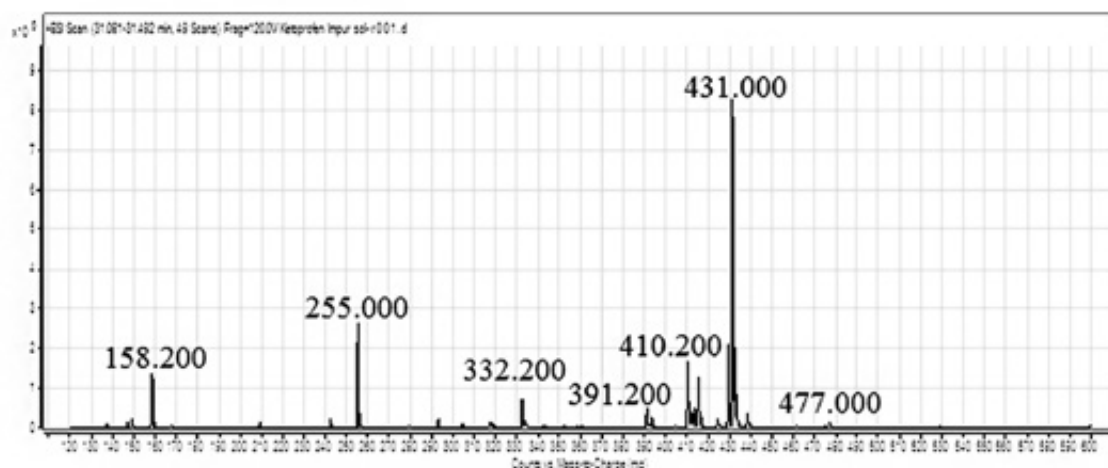


Рисунок 7. Масс-спектр пика с $R_t=36,879$ мин (см. рисунок 6) вещества с $M_r=392$ а.е.м.

Figure 7. The mass spectrum of the peak with $R_t=36,879$ min (see Figure 6) of the substance with $M_r=392$ amu

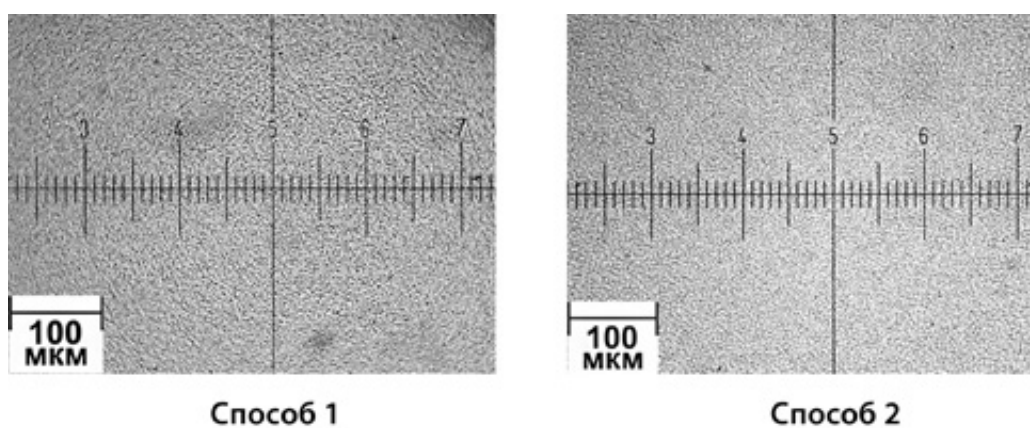


Рисунок 8. Микрофотографии крем-гелей, изготовленных двумя разными способами; увеличение $\times 150$

Figure 8. Microphotographs of cream-gels produced in two different ways; magnification $\times 150$

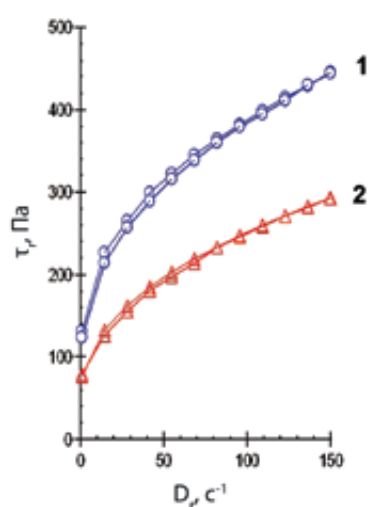


Рисунок 9. Реограммы крем-гелей, изготовленных по способу 1 ($pH=5,5$) и способу 2 ($pH=6,8$), при температуре $25^\circ C$

Figure 9. Rheograms of cream-gels produced according to method 1 ($pH=5.5$) and method 2 ($pH=6.8$), at $25^\circ C$

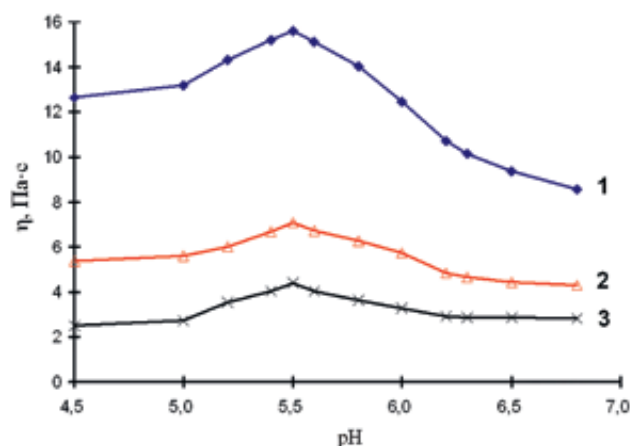


Рисунок 10. Зависимость структурной вязкости (η) крем-гелей от pH при температуре $25^\circ C$ и градиентах скорости сдвига $14,6\text{ c}^{-1}$ (1), $41,6\text{ c}^{-1}$ (2), $82,3\text{ c}^{-1}$ (3)

Figure 10. Relationship between apparent viscosity (η) of cream-gels and their pH at $25^\circ C$ and at shear rates $14,6\text{ s}^{-1}$ (1), $41,6\text{ s}^{-1}$ (2), $82,3\text{ s}^{-1}$ (3)

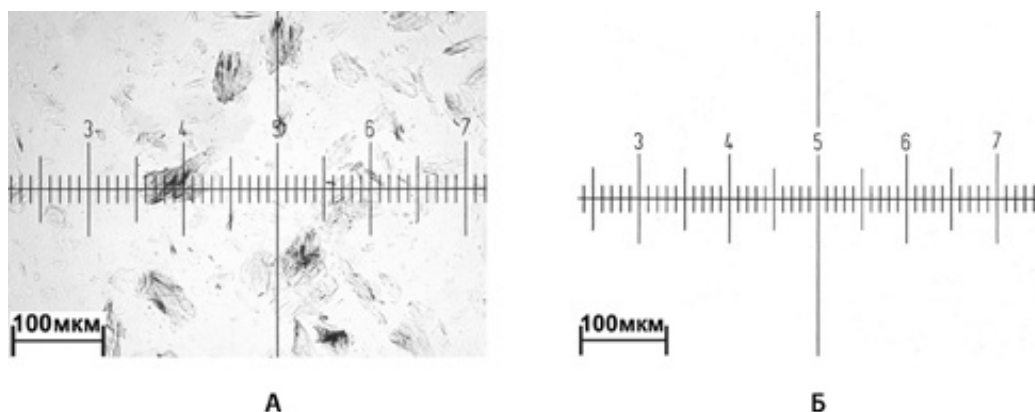


Рисунок 11. Микрофотографии гелей, содержащих кетопрофен, при pH=5,5 (А) и pH=6,0 (Б); увеличение ×150
Figure 11. Microphotographs of containing ketoprofen gels with pH=5,5 (A) and pH=6,0 (B); magnification ×150

кетопрофена (0,85% от 2,5 г); 2,479 г кетопрофена (99,15% от 2,5 г) остались растворены в гидрофобной дисперсной фазе. При введении кетопрофена в виде соли с триметамолом в гидрофильную среду он остаётся преимущественно растворённым в гидрофильной среде, однако 0,193 г кетопрофена из 2,5 г перераспределяются в гидрофобную дисперсную фазу. При введении кетопрофена в гидрофобную фазу и наличии в гидрофильной среде триметамола в эквимольном кетопрофену количестве с избытком 5% кетопрофен в количестве 2,263 г перераспределяется в гидрофильную среду, но 0,237 г кетопрофена остаются растворёнными в гидрофобной фазе.

Распределение кетопрофена в эмульсиях и их pH влияют на образование сложных эфиров кетопрофена в крем-гелях в процессе хранения (рисунки 3 и 12, таблица 4).

Профиль примесей эфиров кетопрофена и их содержание зависят от способа изготовления и pH

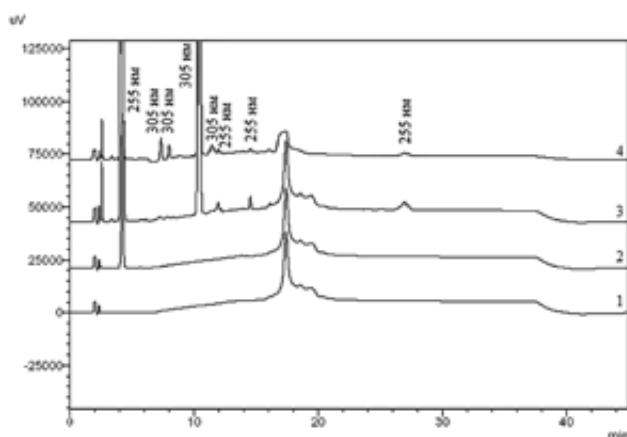


Рисунок 12. Хроматограммы растворителя (1); раствора сравнения кетопрофена (2); растворов крем-гелей, изготовленных по способу 1 (3) и способу 2 (4) после 12 месяцев хранения при температуре (25±2) °C
Figure 12. Chromatograms of the solvent (1); ketoprofen reference solution (2); solutions of cream-gels produced according to method 1 (3) and method 2 (4) after 12-month storage at (25±2) °C

крем-геля, а также от времени хранения (таблица 4). При введении кетопрофена в гидрофобную фазу и pH=5,5 основная часть кетопрофена растворена в смеси метилсалицилата и L-ментола, но некоторая часть оказывается растворённой и в гидрофильной среде (таблица 3). Известно, что снижение pH способствует образованию сложных эфиров, в частности, кетопрофена [5]. Поэтому уже через 3 месяца хранения в крем-геле, который изготовлен по способу 1, профиль примесей включает L-ментоловые эфиры кетопрофена, ПГ эфир кетопрофена и ДГМЭ эфир кетопрофена.

Таблица 4. Содержание примесей кетопрофена и метилсалицилата в крем-гелях с разными pH после 3 и 12 месяцев хранения при температуре (25±2) °C

pH (способ 1 или 2)	Содержание примесей (продуктов разложения/ модификации), %					
	кетопрофена			метилсалицилата		
	Rt=11,6 мин ПГ эфир кетопрофена	Rt=14,3 мин ДГМЭ эфир кетопрофена	Rt=26,4/ 26,9 мин L-ментоловые эфиры кетопрофена	Rt=6,8 мин	Rt=7,4 мин	Rt=11,1 мин
Хранение в течение 3 месяцев						
pH 5,5 (способ 1)	0,17	0,17	0,29	НО	НО	НО
pH 6,8 (способ 2)	НО*	НО	НО	0,16	0,09	0,15
Хранение в течение 12 месяцев						
pH 5,5 (способ 1)	0,58	0,60	0,93	НО	НО	НО
pH 6,8 (способ 2)	0,12	0,16	0,35	1,00	0,60	0,41

Примечание. *НО – не обнаружено. По соотношению сигнал/шум предел обнаружения составляет 0,0015%, а предел количественного определения – 0,0044%.

Note. *ND – not detected. By the signal-to-noise ratio, the detection limit is 0.0015%, and the limit of quantitation is 0.0044%.

При введении кетопрофена в гидрофильную среду основная часть кетопрофена в виде соли растворена в смешанном растворителе вода – ПГ – ДГМЭ (таблица 3). При более высоком pH=6,8 скорость образования сложных эфиров кетопрофена с указанными гидрофильными растворителями оказывается меньше, чем при pH=5,5, и через 3 месяца хранения в крем-геле, который изготовлен по способу 2, эфиры кетопрофена не были обнаружены.

Однако в этом крем-геле с pH=6,8 через 3 месяца хранения образовались 3 другие примеси, которые, судя по их УФ спектрам (рисунок 5), являются продуктами разложения метилсалицилата. Эти примеси не были обнаружены в крем-геле с pH=5,5, который был изготовлен по способу 1 (таблица 4).

После 12 месяцев хранения крем-геля с pH=5,5, изготовленного по способу 1, продукты разложения метилсалицилата не были обнаружены, а профиль примесей кетопрофена не изменился (таблица 4). Однако суммарное содержание эфиров кетопрофена возросло в 3,35 раза.

После 12 месяцев хранения крем-геля с pH=6,8, изготовленного по способу 2, профиль примесей кетопрофена изменился; были обнаружены все три эфира кетопрофена: ПГ эфир кетопрофена, ДГМЭ эфир кетопрофена и L-ментоловые эфиры кетопрофена (таблица 4). Содержание этих эфиров оказалось меньше в 4,8 раза, 3,8 раза и 2,7 раза соответственно по сравнению с крем-гелем, изготовленным по способу 1. Уменьшение содержания ПГ эфира кетопрофена и ДГМЭ эфира кетопрофена связано с повышением pH с 5,5 до 6,8, а снижение содержания L-ментоловых эфиров кетопрофена связано с уменьшением концентрации кетопрофена в смеси метилсалицилата и L-ментола (гидрофобной фазе).

В то же время в крем-геле с pH=6,8 после 12 месяцев хранения, существенно возросло содержание продуктов разложения метилсалицилата, которые не были обнаружены в крем-геле с pH=5,5 (таблица 4). Содержание примесей метилсалицилата, пики которых на хроматограммах имеют времена удерживания (Rt) 6,8 мин, 7,4 мин и 11,1 мин, за 12 месяцев хранения увеличилось до 1,00%, 0,60% и 0,41% (таблица 4).

Таким образом, изготовление крем-геля по способу 1, предполагающему растворение кетопрофена в смеси метилсалицилата и L-ментола, и нормирование его pH на уровне 5,5 позволяет предотвратить образование продуктов разложения метилсалицилата (таблица 4, рисунок 6). После 5 лет хранения крем-геля при температуре 25 °C профиль примесей не изменился (рисунок 6); примеси метилсалицилата отсутствуют, на хроматограмме имеются пики кетопрофена (Rt≈3,902 мин), кетопрофена ПГ эфира

(Rt≈5,172 мин), метилсалицилата (Rt≈4,349 мин), кетопрофена ДГМЭ эфира (Rt≈6,502 мин) и двойной пик кетопрофена L-ментоловых эфиров (Rt≈36,879 мин и Rt≈38,329 мин).

Максимальная суточная доза крем-геля составляет 16 г (по 8 г крем-геля 2 раза в сутки), которые содержат 400 мг кетопрофена. При этом в соответствии с нормативным документом СРМР/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) «Note for Guidance on Impurities in New Drug Products» порог информирования для сопутствующей примеси составляет 0,1%, а порог идентификации и порог квалификации – 0,8 мг примеси, принимаемой в течение суток [9].

По результатам экстраполяции содержание L-ментоловых эфиров кетопрофена через 24 месяца хранения не будет превышать 1,86%, что соответствует максимальной суточной дозе 7,44 мг примесей (в 16 г крем-геля). Эти величины превышают 0,1% и 0,8 мг соответственно, что требует информирования о L-ментоловых эфирах кетопрофена, а также их идентификации и квалификации – определения биологической безопасности при содержании 1,86% или выше.

При отсутствии СО L-ментоловые эфиры кетопрофена могут быть идентифицированы по времени удерживания пиков на хроматограммах и спектру поглощения пиков при использовании хроматографа с диодно-матричным детектором. Квалификация может быть проведена на этапе доклинических исследований в соответствии с требованиями [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано образование сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом в крем-геле при pH 5,5 и 6,8 и разной локализации кетопрофена в дисперсной фазе и дисперсионной среде эмульсии м/в. Указанные примеси идентифицированы по временам удерживания их пиков на хроматограммах по сравнению с веществами сравнения, УФ спектрам и масс-спектрам. Показано, что скорость образования и содержание сложных эфиров кетопрофена с ПГ, ДГМЭ и L-ментолом можно снизить при pH=6,8 и введении кетопрофена в виде соли триметамола в водную среду крем-геля. Однако при этом образуются три примеси, которые по УФ спектрам идентифицированы как продукты разложения метилсалицилата. При хранении такого крем-геля содержание продуктов разложения метилсалицилата возрастает. Поэтому следует растворять кетопрофен в смеси метилсалицилата с L-ментолом и нормировать pH на уровне 5,5. В качестве усилителей проникновения рационально использовать гидрофильные растворители без гидроксильных групп, что ограничит профиль примесей L-ментоловыми эфирами энантиомеров кетопрофена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.03.2019).
2. Комpendиум 2016 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. К.: МОРИОН. 2016; 2416.
3. Шварц Г. Я., Сюбаев Р. Д. Методические указания по изучению новых нестероидных противовоспалительных препаратов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Изд-во «Медицина». 2005; 695–709.
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. 2016; 4016.
5. Зинченко И. А., Ляпунов Н. А., Безуглая Е. П. Исследование образования примесей кетопрофена в модельных растворах. *Фармаком.* 2017; 4: 16–22.
6. Ляпунов Н. А., Зинченко И. А., Безуглая Е. П. Идентификация и количественное определение сложных эфиров кетопрофена. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Медицина. Фармация.* 2018; 41(3): 473–483.
7. Зинченко И. А., Ляпунов Н. А. Аналитические методики определения декскетопрофена и сопутствующих примесей в геле: валидация и применение на этапе разработки препарата. *Фармаком.* 2015; 3/4: 12–20.
8. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. Ч. I. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна и др. М.: Изд-во «Спорт и культура – 2000». 2007; 5–92.
9. CPMP/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) Note for Guidance on Impurities in New Drug Products, June 2006.

REFERENCES

1. Register of medicines of Russia. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 05.08.2018) (In Russ.).
2. Compendium 2016 – drugs / Ed. V. N. Kovalenko. Kiev: Publishing house «MORION». 2016; 2416 (In Russ.).
3. Shvarts G. Ya., Syubaev R. D. Guidelines for the study of new nonsteroidal anti-inflammatory drugs // Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances / Ed. R. U. Khabriev. – 2nd ed., amended. Moscow: Publishing house «Medicine». 2005; 695–709 (In Russ.).
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. 2016; 4016.
5. Zinchenko I. A., Lyapunov N. A., Bezuglaya E. P. Study of the formation of ketoprofen impurities in model solutions. *Farmakom.* 2017; 4: 16–22 (In Russ.).
6. Lyapunov N. A., Zinchenko I. A., Bezuglaya E. P. Identification and assay of ketoprofen esters. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Meditsina. Farmatsiya – Belgorod State University Scientific bulletin. Medicine. Pharmacy.* 2018; 41(3): 473–483 (In Russ.).
7. Zinchenko I. A., Lyapunov N. A. Analytical procedures for the determination of dexketoprofen and related impurities in the gel: validation and use during drug development. *Farmakom.* 2015; 3/4: 12–20 (In Russ.).
8. Guide for enterprises of the pharmaceutical industry. Guidelines. Part I. Guidelines on the validation of analytical procedures for analysis of medicinal products / Ed. N. V. Yurgel, A. L. Mladentsev, A. V. Burdein et al. Moscow: Publishing house «Sport and Culture – 2000». 2007; 5–92 (In Russ.).
9. CPMP/ICH/2738/99 (ICH Topic Q3B (R2)) Note for Guidance on Impurities in New Drug Products, June 2006.



Обучающий курс для предприятий «Исследования фармакокинетики и биоэквивалентности: надлежащая и ненадлежащая практика»

GLP/ISO-9001-сертифицированная лаборатория «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» приглашает на обучающий курс для предприятий **«Исследования фармакокинетики и биоэквивалентности: надлежащая и ненадлежащая практика»**. Курс предназначен для сотрудников отделов разработки, регистрации лекарственных средств, медицинских отделов, а также контрактно-исследовательских организаций.

Слушатели предварительно могут прислать список интересующих их вопросов по теме семинара, которые обязательно будут рассмотрены. Обучение построено по принципу **адаптивного семинара**, поэтому длительность каждой из лекций, уровень сложности (базовый или продвинутый) и тематические акценты определяется исходя из потребностей аудитории. Курс также подразумевает решение ситуационных задач и практических занятий. По окончании семинара проводится тестирование слушателей и выдача сертификатов участника.

Будут рассмотрены такие темы как:

- ✓ Проектное управление исследованием фармакокинетики и биоэквивалентности.
- ✓ Взаимосвязь результатов исследований СТР и БЭ.
- ✓ Клинический, биоаналитический, статистический этапы исследования: надлежащая и ненадлежащая практика.
- ✓ Статистическая обработка результатов исследования с применением свободного программного обеспечения.
- ✓ Особенности исследований биопрепаратов, включая моноклональные антитела.



Курс читает генеральный директор ООО «ЦФА» доктор фармацевтических наук **Шохин Игорь Евгеньевич**.

Главный редактор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Ведущий переводчик и научный редактор русского издания Европейской Фармакопеи.

Председатель оргкомитета цикла конференций «Исследования кинетики растворения, фармакокинетики и биоэквивалентности».

Автор монографии «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств».

А также:

- сотрудники ООО «ЦФА» (руководители направлений);
- приглашенные лектора.

Стоимость мероприятия **14 900 руб.** с человека (при проведении выездного семинара для групп менее 10 человек стоимость обучения составляет **149 000 руб./группа**)*.

Обучение может проводиться как на базе ООО «ЦФА» (г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3), ближайшая дата обучения – **13-14 июня 2019 г.**, так и на базе Вашего предприятия в удобное для Вас время.

*Стоимость проезда, проживания и командировочные расходы при проведении выездного семинара за пределами Москвы оплачивается отдельно.

Курс проводится при технической поддержке

ERWEKA

ООО «ЦФА»

Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел: +7 (499) 281-81-11 info@cpha.ru www.cpha.ru

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-66-73
УДК 615.4; 544.77.022; 544.77.023.5; 544.77.03

Оценка влияния технологических факторов на стабильность липосом фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда

Т. А. Тимофеева^{1*}, М. В. Дмитриева¹, Л. Л. Николаева^{1,2}, О. Л. Орлова¹, Н. А. Оборотова¹,
А. П. Полозкова¹, И. И. Краснюк²

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

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

*Контактное лицо: Тимофеева Таисия Анатольевна. E-mail: taisiyatim@yandex.ru. Тел.: 8 (499) 612 81 86

ORCID: М. В. Дмитриева – 0000-0001-6740-5692; Л. Л. Николаева – 0000-0001-8003-8241; Н. А. Оборотова – 0000-0002-6986-3942

Researcher ID: М. В. Дмитриева – H-7433-2018; Л. Л. Николаева – C-8929-2018; О. Л. Орлова – H-7310-2018; Н. А. Оборотова – H-7299-2018; А. П. Полозкова – H-7354-2018

Статья получена: 01.03.2019. Статья принята к печати: 23.04.2019

Резюме

Введение. Липосомальные технологии нашли широкое применение в медицине и косметологии как системы доставки диагностических и лекарственных средств и биологически активных веществ. Несомненную практическую значимость на этапе разработки липосомального препарата представляют характеристика и оценка устойчивости получаемого продукта, причем изучению последней уделено особое внимание. Существенным образом на стабильность липосом влияют способы их получения, поэтому весьма актуальным является изучение влияния технологических факторов на свойства продукта на различных этапах получения липосом. Настоящая статья посвящена исследованию зависимости качества липосом, нагруженных фталоцианиновым фотосенсибилизатором – тиосенсом, от условий их получения.

Цель. Выявление влияния различных технологических факторов на показатели стабильности липосомальной формы фотосенсибилизатора тиосенса.

Материалы и методы. С этой целью проводили анализ среднего размера, полидисперсности и дзета (ζ)-потенциала липосом тиосенса, получаемых на стадии гидратации липидной пленки, фильтрации липосомальной дисперсии, ее экструзии, гомогенизации, ультразвуковой обработки и лиофилизации.

Результаты и обсуждение. В ходе получения липосомального препарата можно производить различные изменения условий в рамках технологического процесса. На каждом этапе получения липосомальной формы существует множество критических точек и параметров, которые необходимо строго отслеживать и контролировать. В ходе работы проведена оценка влияния технологических факторов на стабильность липосомальных промежуточных и готового продукта. Определены условия наиболее эффективной гидратации с образованием стабильной дисперсии многослойных липосом тиосенса и оптимального метода их измельчения. Также показано, что образующиеся после регидратации лиофилизата липосомы более однородны по размеру и имеют наиболее высокое значение ζ -потенциала в сравнении с нелиофилизированной липосомальной дисперсией.

Заключение. На примере липосом фталоцианинового фотосенсибилизатора тиосенса показано влияние различных технологических факторов на показатели стабильности данной наноструктуры, поэтому несомненную практическую значимость на стадии разработки и получения липосомального препарата представляет характеристика и оценка устойчивости полученного продукта по 3 основным показателям – размеру везикул, индексу полидисперсности и ζ -потенциалу.

Ключевые слова: технологические факторы, стабильность, липосомы, размер, дзета-потенциал, индекс полидисперсности, тиосенс.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Тимофеева Т. А., Дмитриева М. В., Николаева Л. Л., Орлова О. Л., Оборотова Н. А., Полозкова А. П., Краснюк И. И. Оценка влияния технологических факторов на стабильность липосом фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 66–73.

Assessing the Impact of Technological Factors on the Stability of Liposomes the Photosensitizer Phthalocyanine Series

Т. А. Timofeeva^{1*}, М. В. Dmitrieva¹, Л. Л. Nikolaeva^{1,2}, О. Л. Orlova¹, Н. А. Oborotova¹,
А. П. Polozkova¹, I. I. Krasnyuk²

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

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

*Corresponding author: Taisiya A. Timofeeva. E-mail: taisiyatim@yandex.ru. Tel.: 8 (499) 612 81 86

ORCID: М. В. Dmitrieva – 0000-0001-6740-5692; Л. Л. Nikolaeva – 0000-0001-8003-8241; Н. А. Oborotova – 0000-0002-6986-3942

Researcher ID: М. В. Dmitrieva – H-7433-2018; Л. Л. Nikolaeva – C-8929-2018; О. Л. Orlova – H-7310-2018; Н. А. Oborotova – H-7299-2018; А. П. Polozkova – H-7354-2018

Received: 01.03.2019. Accepted: 23.04.2019

Abstract

Introduction. Liposomal technologies are widely used in medicine and cosmetology as a delivery system for diagnostic and medicinal products and biologically active substances. The undoubted practical importance at the stage of development of a liposomal preparation is represented by the characteristic and assessment of the sustainability of the obtained product, and special attention is paid to the study of the latter. Essentially, the methods for their preparation affect the stability of liposomes; therefore, the study of the influence of technological factors on the properties of the product at various stages of the preparation of liposomes is very important. This article is devoted to the study of the dependence of the quality of liposomes loaded with a phthalocyanine photosensitizer – thiosens, on the conditions of their production.

Aim. Detection of the influence of various technological factors on the stability indicators of the liposomal form of the thiosens photosensitizer.

Materials and methods. For this purpose, an analysis of the average size, polydispersity and zeta (ζ) potential of the liposomes of thiosens obtained at the stage of hydration of the lipid film, filtration of the liposomal dispersion, its extrusion, homogenization, ultrasonic treatment, and lyophilization was carried out.

Results and discussion. During the preparation of a liposomal preparation, various changes in conditions can be made within the framework of the technological process. At each stage of obtaining a liposomal form, there are many critical points and parameters that must be strictly monitored and controlled. In the course of the work, the influence of technological factors on the stability of liposomal intermediate and finished products was assessed. The conditions of the most effective hydration with the formation of a stable dispersion of multilayer liposomes of thiosens and the optimal method of their grinding have been determined. It was also shown that liposomes formed after rehydration of the lyophilisate are more uniform in size and have the highest ζ -potential value in comparison with non-lyophilized liposomal dispersion.

Conclusion. Using the example of a thiosens phthalocyanine photosensitizer liposomes, the influence of various technological factors on the stability of this nanostructure is shown, therefore, the characteristic and assessment of the sustainability of the resulting product according to 3 main indicators – vesicle size, polydispersity index, and ζ -potential are of undoubted practical importance.

Keywords: technological factors, stability, liposomes, size, zeta-potential, polydispersity index, thiosens.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Timofeeva T. A., Dmitrieva M. V., Nikolaeva L. L., Orlova O. L., Oborotova N. A., Polozkova A. P., Krasnyuk I. I. Assessing the impact of technological factors on the stability of liposomes the photosensitizer phthalocyanine series. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 66–73.

ВВЕДЕНИЕ

Многофункциональность липосом позволяет рассчитывать на их успешное применение в терапии различных патологий, а создание липосомальных форм препаратов является актуальной задачей отечественной фармации. Однако существенным ограничением по внедрению липосомальных препаратов для широкого клинического применения является отсутствие их промышленного производства, связанное с их особенностями и сложностями технологии получения. Липосомы чувствительны к любым колебаниям внешних условий, так как относятся к коллоидным дисперсным системам и являются термодинамически неустойчивыми структурами, что обуславливает их стремление к агрегации частиц и формированию более крупных структур. Данное явление, в свою очередь, может привести к изменению фармакологических свойств препарата.

В 2018 г. FDA опубликовало новое руководство по липосомальным препаратам, в котором представила окончательные рекомендации по их производству, в том числе по химическим аспектам и контролю качества на производстве, изучению фармакокинетики и биодоступности и маркировке данных препаратов. В руководстве FDA ссылается на принципы Quality-by-Design в соответствии с ICHQ8(R2) «Фармацевтическая разработка», где учитываются критические факторы – критические характеристики качества, которые представляют собой физические, химические, биологические и микробиологические свойства продукта. Рекомендуется описание отдельных операций с уточнением технологических режимов. Технологические параметры должны быть обоснованы данными фармацевтических исследований. В течение процесса разработки липосомального продукта должен быть обеспечен соответствующий контроль качества. Примерами технологических параметров, которые могут повлиять на свойства липосом, являются: сила трения, давление, pH, температура, параметры лиофилизации,

время хранения (которое зависит от объема произведенной партии) и т.д. [1].

Таким образом, важное место в процессе разработки липосомального препарата занимает исследование свойств полупродуктов и оценка их устойчивости на различных стадиях технологического процесса.

Как правило, для характеристики стабильности липосомального препарата используют 3 основных показателя – размер везикул, индекс полидисперсности и дзета- (ζ) -потенциал [2–4]. Размер везикул является важным параметром, который определяет механизм взаимодействия липосомы с клеткой [5–8]. Наиболее востребованными в онкологии стали липосомы размером от 100 до 200 нм [9, 10]. Ширину распределения липосом по размерам характеризуют по индексу полидисперсности (polydispersityindex, PDI). Его значения ранжируются от 0 до 1. Чем ближе значение к 0, тем частицы более гомогенны [5, 6, 11]. ζ -потенциал является важным индикатором поверхностного заряда частиц и мерой отталкивания или притяжения между частицами. Липосомы с высоким ζ -потенциалом отталкиваются друг от друга, а с низким – агрегируют и образуют нестабильные составы [12, 13].

Целью настоящего исследования являлось выявление влияния различных технологических факторов на показатели стабильности липосомальной формы отечественного фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда – тиосенса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: субстанция тиосенса – тетра-3-фенилтиофталоцианина алюминия гидроксида (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия), яичный фосфатидилхолин (лецитин; E PC S, Lipoid, Германия), холестерин (Sigma-Aldrich, Co., Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароифосфатидилэтанолламин (ПЭГ-2000-ДСФЭ; Lipoid, Германия), сахароза ГОСТ 5833-75 (Химмед, Россия), вода очищенная ФС.2.2.0020.18, вода для инъекций ФС.2.2.0019.18, спирт этиловый 95%, ФС.2.1.0036.15 (ОАО «Флора Кавказа», Россия), хлоро-

форм (трихлорметан) стабилизированный 0,6–1,0% масс. этанола «ХЧ» (Химмед, Россия).

Материал для фильтрации и экструзии: поликарбонатные мембранные фильтры Nuclepore (Whatman, Великобритания) диаметром 25 мм, с размером пор 0,2 мкм; нейлоновые мембранные фильтры N66 диаметром 25 мм с размером пор 0,22, 0,45 и 1,2 мкм (ООО Палл Евразия, Россия); полиэфирсульфоновые фильтры «ExpressPlus®» диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия), фильтр из сложных эфиров целлюлозы диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия); поливинилиденфторидовые фильтры диаметром 25 мм, с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore Ltd., Ирландия).

Оборудование: весы лабораторные DL-120 (AND, Япония), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), ротормный испаритель Heidolph Hei-VAP Advantage (Heidolph, Германия) с отгонной колбой на 2 л, экструдер Lipex TM Thermo barrel Extruder 10 мл (NorthernLipidsInc., Канада), УЗ-ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), гомогенизатор высокого давления Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания).

Методы

Методика получения многослойных липосом (МСЛ)

Ингредиенты липосомального бислоя (лецитин, холестерин, ПЭГ-2000-ДСФЭ) растворяют в хлороформе. К субстанции тиосенса добавляют хлороформ и помещают в УЗ ванну на 5–10 мин для ускорения процесса растворения. Полученные растворы смешивают и переносят в круглодонную колбу. Растворитель отгоняют при температуре выше температуры фазового перехода лецитина ($+37 \pm 1$ °C) на ротормном испарителе с получением однородной полупрозрачной липидной пленки, которую затем гидратируют. Фильтруют полученную дисперсию МСЛ на экструдере через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с размером пор 1,2 мкм и 0,45 мкм.

Методика получения однослойных липосом (ОСЛ)

- ✓ **Экструзия.** Профильтрованную дисперсию липосом тиосенса пропускают через фильтры различных типов с размером пор 0,2–0,22 мкм с использованием экструдера под давлением 0,9–1,0 МПа.
- ✓ **УЗ-обработка.** Профильтрованную дисперсию МСЛ тиосенса в объеме 30 мл обрабатывают на УЗ ванне с частотой 20 кГц в течение 1–60 мин.
- ✓ **Гомогенизация.** Профильтрованную дисперсию МСЛ тиосенса в объеме 60 мл пропускают на гомогенизаторе под давлением 40 psig (280 кПа) в течение 1–5 мин.

Анализ стабильности образцов липосомального тиосенса

Измерение размера, ζ -потенциала, PDI липосомального тиосенса проводили с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS.

Методика пробоподготовки образца

0,1 мл липосомальной дисперсии (лиофилизат предварительно размораживают до комнатной температуры и регидратируют 5,6 мл воды) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученное разведение оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Разведенный образец переносят в кювету из полистирола, которую помещают в ячейку анализатора и проводят измерение показателей образца. Определение каждого показателя проводят не менее трех раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время происходит смещение акцента с анализа готовой продукции на аналитический контроль производства, т.е. качество должно быть заложено в продукт и контролироваться в процессе производства [14].

Известно, что изменение технологических факторов может сказываться на качестве получаемого продукта, поэтому так важно выяснить какое влияние это изменение оказывает на характеристики и показатели стабильности.

В ходе получения липосомального препарата можно производить различные изменения условий в рамках технологического процесса (рисунок 1).

Стадия гидратации липидной пленки

Первым этапом в технологическом процессе получения липосомального препарата является получение тонкой липидной пленки. Операции по получению хлороформного раствора компонентов липосомальной формы тиосенса и образованию липидной пленки проводили согласно ранее разработанному методу Санаровой Е.В. [15] без вариации условий.

После формирования липидной пленки и полного удаления остатков органического растворителя проводили ее диспергирование (гидратацию) с получением дисперсии МСЛ тиосенса. Согласно упомянутой методике смыв липидной пленки с лекарственной субстанцией осуществляют водой для инъекций при комнатной температуре. Однако условия этой стадии могут быть подвергнуты изменениям, что может повлиять на характеристики получаемой дисперсии. При гидратации пленки необходимо учитывать ряд факторов: температуру, величину pH и ионную силу буфера, концентрацию липидов и соотношение липид / лекарственное вещество (субстанция), физико-химические свойства используемых компонентов. При этом размер образующихся везикул определяется так же интенсивностью и временем перемешивания. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должны быть выше температуры фазового перехода используемого липида [16]. Кроме того, к таким технологическим факторам можно от-



Рисунок 1. Этапы получения липосом тиосенса

Figure 1. The steps of obtaining liposomes of tirosens

нести значение давления в процессе смыва пленки и тип регидранта, которые и были исследованы в данной работе.

Добавление криопротектора (раствор сахарозы 10%) традиционно происходит после измельчения липосом тиосенса, однако его также можно вводить на этапе гидратации липидной пленки от чего также могут изменяться показатели стабильности дисперсии.

При обычных условиях на стадии гидратации липидной пленки наблюдается образование пены, что частично затрудняет процесс фильтрации/экструзии липосомальной дисперсии. Пенообразование вероятно обусловлено высокой концентрацией липидов в дисперсии, в частности фосфотидилхолина – 75 мг/мл. В связи с этим для решения задачи подавления пенообразования рассмотрена возможность проведения гидратации липидной пленки в условиях низкого давления (под вакуумом) – с использованием метода вакуумной дегазации.

Как известно, дегазацией называют удаление из воды газов, растворенных в ней или образующихся в процессе ее обработки. Для этого понижают давления до величины, при которой вода кипит без дополнительного подогрева в вакуумных дегазаторах, так называемая «холодная» деаэрация или вакуумная дегазация [17]. Применительно к технологии липосомальных форм, преимуществом использования вакуума при гидратации липидной пленки, помимо снижения образования пены, является удаление из дисперсии кислорода, который приводит к перекисному окислению липосомальных липидов.

В результате анализа качества дисперсий МСЛ тиосенса, полученных как с использованием вакуума (200 мбар) и без, при гидратации пленки водой для инъекций или раствором сахарозы 10% установлено, что пониженное давление оказывает положительный эффект на процесс формирования липосом (таблица 1). Образующиеся липосомы при использовании обоих режимов имели практически одинаковый размер, но дисперсия, получаемая под воздействием вакуума является однородной (гомогенной) и более стабильной – разница в значении ζ -потенциала составляет 8,2 mV. При этом липосомы, получаемые при смыве раствором сахарозы имеют меньший ζ -потенциал, а значит, не смотря на меньшие размеры и индекс полидисперсности, являются менее устойчивыми.

Стадия фильтрации

Под фильтрованием понимается процесс разделения гетерогенных систем с твердой дисперсной фазой посредством пористой перегородки (фильтра), которая пропускает жидкость (фильтрат) и задерживает взвешенные твердые частицы. Липосомальная дисперсия до фильтрации может содержать значительное количество видимых и невидимых механических частиц, которые представляют собой случайные посторонние подвижные нерастворимые частицы, в том числе фракцию «не включенного» в везикулы ЛВ, за исключением пузырьков газа.

В процессе получения липосомального тиосенса дисперсию МСЛ фильтруют под давлением посред-

Таблица 1. Влияние вакуума на внешний вид и показатели стабильности липосомальной дисперсии при гидратации липидной пленки

Table 1. The effect of vacuum on the appearance and stability of liposomal dispersion in the hydration of the lipid film

Режим гидратации пленки		Внешний вид дисперсии	Значение ζ -потенциала, мВ	Размер липосом, нм	Значение PDI
Без сахарозы	Без вакуума	Пенистая дисперсия зеленого цвета	$-(25,7 \pm 2,5)$	959 ± 25	$0,933 \pm 0,032$
	С вакуумом (200 мбар)	Гомогенная дисперсия зеленого цвета	$-(33,9 \pm 3,1)$	1416 ± 33	$0,846 \pm 0,041$
С сахарозой	Без вакуума	Пенистая дисперсия зелено-голубого цвета	$-(25,2 \pm 2,7)$	561 ± 24	$0,700 \pm 0,052$
	С вакуумом (200 мбар)	Гомогенная дисперсия зелено-голубого цвета	$-(16,7 \pm 2,3)$	354 ± 21	$0,531 \pm 0,039$

вом пропускания в экструдере через нейлоновые мембраны с диаметром пор 1,2 и 0,45 мкм. При этом наблюдается изменение основных показателей стабильности — постепенное уменьшение размера и незначительное увеличение ζ -потенциала (таблица 2).

Таблица 2. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии после пропускания через фильтры с диаметром пор 1,2 мкм и 0,45 мкм

Table 2. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion after passing through filters with a pore diameter of 1.2 μ m and 0.45 μ m

Показатели	До фильтрации	1,2 мкм	0,45 мкм
Значение ζ -потенциала, мВ	$-(18,0 \pm 1,8)$	$-(20,6 \pm 2,1)$	$-(20,2 \pm 1,5)$
Размер везикул, нм	855 ± 26	683 ± 22	323 ± 15
Значение PDI	$0,576 \pm 0,072$	$0,666 \pm 0,063$	$0,438 \pm 0,034$

Стадия измельчения

За стадией фильтрации дисперсии МСЛ тиосенса следует стадия их измельчения. Для измельчения липосомальных дисперсий чаще всего применяют методы экструзии и гомогенизации / микрофлюидизации; гораздо реже используют методы обработки УЗ.

С целью сравнения влияния различных методов получения ОСЛ тиосенса на устойчивость продукта оценивали показатели стабильности дисперсии, полученные при измельчении дисперсии МСЛ вышеперечисленными методами.

Экструзия

Эффективность измельчения и стабильность липосомального препарата при экструзии зависит от типа используемого фильтра и количества циклов пропускания. Экструзия липосомальной дисперсии проводилась с использованием фильтров с диаметром пор 0,2–0,22 мкм пяти типов – нейлоновых (Н), полиэфирсульфоновых (ПЭС), фильтров из сложных эфиров целлюлозы (СЭЦ), поливинилиденфторидовых (ПВДФ) и поликарбонатных (ПК). Основные показатели стабильности измерялись после первого, третьего и пятого циклов пропускания липосомальной дисперсии через

экструдер для каждого типа фильтра соответственно (таблица 3).

Из представленных данных видно, что для измельчения МСЛ тиосенса наиболее эффективно использование ПВДФ-фильтра – отмечается ступенчатое снижение размеров везикул и PDI. При использовании других типов фильтров значения данных показателей колеблются как в сторону уменьшения, так и увеличения. Однако значение ζ -потенциала выше у образца дисперсии, полученной при экструзии с Н-фильтрами. Таким образом, тип фильтра может влиять на стабильность липосомальной конструкции, что следует учитывать при подборе оптимального режима экструзии.

Гомогенизация липосомальной дисперсии тиосенса проводилась с помощью микрофлюидизера. При использовании этого метода измельчения эффективность процесса в основном зависит от количества циклов или времени рециркуляции, в течение которого она находится в аппарате. Чтобы выяснить влияние времени циркуляции на устойчивость липосом производили отбор проб после каждого цикла и измеряли основные показатели стабильности. Результаты измерений приведены в таблице 4.

Согласно указанным данным, с увеличением времени циркуляции дисперсии в микрофлюидизере наблюдается постепенное уменьшение размера везикул, который через 4 мин достиг минимального значения 138 нм при величине PDI 0,311. В то же время с увеличением периода циркуляции до 2 мин отмечается резкое снижение значения ζ -потенциала – на 7 мВ, однако в дальнейшем происходит постепенное его увеличение практически до первоначального значения. Таким образом, обобщая результаты эксперимента, можно сделать вывод, что гомогенизация влияет на стабильность липосомального препарата, при этом уровень воздействия определяется временем циркуляции дисперсии.

УЗ-обработка

Поскольку эффективность измельчения при УЗ-обработке в основном зависит от времени озвучивания, липосомальную дисперсию тиосенса объемом 30 мл помещали на УЗ ванну и обрабатывали в течение

Таблица 3. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при экструзии
Table 3. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion during extrusion

Тип фильтра	Н			ПЭС			ПК			ПВДФ			СЭЦ		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
Количество циклов															
Значение ζ -потенциала, мВ	-(21,2±2,9)	-(18,0±1,9)	-(26,0±2,1)	-(17,0±1,9)	-(14,9±2,2)	-(14,7±1,7)	-(26,2±3,0)	-(10,2±2,1)	-(13,7±2,2)	-(22,6±2,7)	-(17,3±2,8)	-(15,1±1,8)	-(13,8±1,9)	-(19,5±1,6)	-(18,8±2,0)
Размер везикул, нм	284±16	325±15	229±10	335±20	217±11	225±10	311±17	324±12	386±21	253±16	243±14	213±8	310±21	316±18	319±17
Значение PDI	0,328±0,077	0,457±0,067	0,217±0,031	0,386±0,054	0,155±0,030	0,244±0,031	0,440±0,069	0,504±0,058	0,567±0,034	0,647±0,055	0,348±0,026	0,200±0,031	0,460±0,047	0,270±0,038	0,440±0,035

1–60 мин с отбором образцов препарата через определенные промежутки времени – 1, 5, 10, 20, 30 45 и 60 мин. Для оценки стабильности полученных образцов дисперсий проводили измерения размера липосом, PDI и ζ -потенциала, значения которых представлены в таблице 5.

Полученные результаты проведенного исследования показывают отсутствие корреляционной зависимости между временем воздействия УЗ на дисперсию и значениями показателей стабильности. Изменения значений для каждого отдельно взятого показателя носят волнообразный характер. Так, наиболее высокие значения ζ -потенциала наблюдаются спустя 1 и 45 мин от начала воздействия, а минимальные — через 30 и 60 мин. В то же время при измельчении липосом в течение 30 мин отмечается скачкообразное изменение среднего размера везикул, однако после достижения минимального значения (308 нм) происходит их рост в диаметре. Таким образом, измерение показателей стабильности для оценки устойчивости липосомальной дисперсной системы в случае измельчения везикул УЗ не является информативным.

Таким образом, обобщая данные сравнительного анализа исследуемых методов измельчения МСЛ тиосенса, можно сделать вывод, что экструзия позволяет получать наиболее стабильные дисперсии. При экструзии наблюдается наименьший размер частиц и индекс полидисперсности при самом высоком значении ζ -потенциала.

Лиофилизация

Хранение липосомального препарата в «жидком» виде сопряжено с рядом проблем, наиболее существенным из которых являются: окисление и гидролиз используемых фосфолипидов, главным образом, ненасыщенных, а также ряд физических изменений (агрегация, слияние и др.) в дисперсии. В связи с этим для стабилизации липосом наиболее широко используют метод лиофилизации [18].

Целью заключительного этапа исследования являлась оценка влияния сублимационного высушивания на устойчивость липосомального препарата путем сравнения показателей стабильности как до, так и после лиофилизации дисперсии ОСЛ тиосенса.

В качестве криопротектора при лиофилизации липосомального тиосенса использовали сахарозу, которую вводили в дисперсию после стадии измельчения до ее конечной концентрации 10%. Лиофилизацию проводили, используя методику медленного замораживания.

По результатам проведенного исследования, приведенным в таблице 6, видно, что лиофилизация способствует значительному повышению значения ζ -потенциала, сохранению размеров везикул и получению наиболее гомогенной дисперсии после регидратации лиофилизата.

Таблица 4. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при гомогенизации

Table 4. The results of the measurements of the main indicators of the stability of the liposomal dispersion under homogenization

Показатели стабильности	Время, мин				
	1	2	3	4	5
Значение ζ -потенциала, мВ	-(17,2 \pm 1,8)	-(10,2 \pm 2,7)	-(12,1 \pm 1,9)	-(16,2 \pm 1,9)	-(17,8 \pm 2,3)
Размер везикул, нм	181 \pm 10	158 \pm 8	142 \pm 5	138 \pm 6	147 \pm 5
Значение PDI	0,417 \pm 0,053	0,439 \pm 0,041	0,403 \pm 0,024	0,311 \pm 0,025	0,519 \pm 0,030

Таблица 5. Результаты измерений основных показателей стабильности липосомальной дисперсии при воздействии УЗ

Table 5. Results of measurements of the main indicators of stability of liposomal dispersion under the influence of ultrasound

Показатели стабильности	Время						
	1 мин	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин	45 мин	60 мин
Значение ζ -потенциала, мВ	-(24,0 \pm 3,1)	-(21,1 \pm 3,3)	-(20,1 \pm 2,5)	-(22,5 \pm 2,4)	-(18,6 \pm 2,1)	-(23,8 \pm 1,8)	-(16,5 \pm 2,2)
Размер везикул, нм	340 \pm 20	424 \pm 24	322 \pm 18	392 \pm 19	308 \pm 15	334 \pm 25	354 \pm 16
Значение PDI	0,455 \pm 0,062	0,456 \pm 0,050	0,310 \pm 0,036	0,593 \pm 0,044	0,494 \pm 0,041	0,511 \pm 0,038	0,628 \pm 0,046

Таблица 6. Показатели стабильности до и после лиофилизации липосом тиосенса

Table 6. Stability before and after lyophilization of the liposomes of tiosens

	Показатели качества		
	Размер везикул, нм	Значение PDI	Значение ζ -потенциала, мВ
До лиофилизации	229 \pm 13	0,217 \pm 0,032	-(26,0 \pm 3,3)
После лиофилизации	220 \pm 10	0,180 \pm 0,020	-(35,0 \pm 2,3)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На каждом этапе получения липосомального препарата существует множество критических точек и параметров, которые необходимо строго отслеживать и контролировать. В результате проведенных исследований проведена оценка влияния технологических факторов на стабильность липосомальных промежуточных и готового продуктов. Показано, что наиболее эффективная гидратация с образованием стабильной дисперсии МСЛ тиосенса проходит в условиях вакуума и с использованием в качестве регидранта воды для инъекций. В результате сравнительного анализа способов получения ОСЛ тиосенса установлено, что измельчение МСЛ целесообразнее проводить с применением методов экструзии с использованием нейлоновых фильтров с размером пор 0,22 мкм и гомогенизации, что обусловлено высокой производительностью указанных методов и сохранением стабильности липосом. Также показано, что образующиеся после регидратации лиофилизата липосомы более однородны по размеру и имеют наиболее высокое значение ζ -потенциала в сравнении с нелиофилизированной липосомальной дисперсией.

ЛИТЕРАТУРА

1. New FDA Guidance on Liposomes. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/new-fda-guidance-on-liposomes>.
2. Matuszak J., Baumgartner J., Zaloga J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing. *Nanomedicine*. 2016; 11(6): 597–616. DOI: 10.2217/nnm.15.216.
3. 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; 11(12): e0167787. DOI:10.1371/journal.pone.0167787.
4. Oskuee R. K., Mahmoudi A., Gholami L. et al. Cationic liposomes modified with polyallylamine as a gene carrier: preparation, characterization and transfection efficiency evaluation. *AdvPharmBull*. 2016; 6(4): 515–520. DOI: 10.15171/apb.2016.065.
5. Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T. et al. Measuring sub nanometre sizes dynamic light scattering. *J Nanopart Res*. 2008; 10: 823–829.
6. Suhaimi S. H., Hasham R., Rosli N. A. Effects of formulation parameters on particle size and polydispersity index of orthosiphonstamineus loaded nanostructured lipid carrier. *Journal of advanced research in applied sciences and engineering technology*. 2015; 1(1): 36–39.
7. Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. *Вестник РАМН*. 2012; 3: 23–30.
8. Дёмина 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; LVI(3–4): 5–10.
9. Oborotova N., Treshalina H., Bashakova Z. et al. Possible application of the new lipidocytostatic D-152 in different drug formulation. *Pharmaceutski vestnik, Ljubljana*. 1997; 48: 278–279.
10. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010; 27: 2569–2589. DOI: 10.1007/s11095-010-0233-4.
11. Бабаджанянц Л. К., Войтылов А. В., Войтылов В. В., Трусов А. А. Анализ полидисперсности макромолекулярных и нанодисперсных систем электрооптическими методами. *Высокомолекулярные соединения. Серия С*. 2010; 52(5): 1–12.
12. 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; 377(1): 159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
13. Riaz M. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996; 19(1): 65–77.
14. Шанская А. И., Пучкова С. М., Яковлева Т. Е. Липосомы – перспективная форма лекарственных препаратов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2011; 3(37): 100–104.
15. Санарова Е. В. Автореферат «Создание и биофармацевтическое изучение новой липосомальной лекарственной формы тиосенса для фотодинамической терапии». 2013; 24.
16. Краснопольский Ю. М., Степанов А. Е., Швецов В. И. и др. Липидная технологическая платформа для создания новых лекарственных форм и транспорта активных фармацевтических субстанций. *Биофармацевтический журнал*. 2011; 3(2): 10–18.
17. Абиев Р. Ш., Васильев М. П., Доильницын В. А. Исследование процесса вакуумной дегазации воды в вихревом струйном аппарате. *Известия СПбГТИ(ТУ). I. Химия и химическая технология. Процессы и аппараты*. 2015; 28: 64–69.

18. Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б. и др. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. М., 2015; 70–183.

REFERENCES

1. New FDA Guidance on Liposomes. Available at: <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/new-fda-guidance-on-liposomes>.
2. Matuszak J., Baumgartner J., Zaloga J. et al. Nanoparticles for intravascular applications: physicochemical characterization and cytotoxicity testing. *Nanomedicine*. 2016; 11(6): 597–616. DOI: 10.2217/nnm.15.216.
3. 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; 11(12): e0167787. DOI:10.1371/journal.pone.0167787.
4. Oskuee R. K., Mahmoudi A., Gholami L. et al. Cationic liposomes modified with polyallylamine as a gene carrier: preparation, characterization and transfection efficiency evaluation. *AdvPharmBull*. 2016; 6(4): 515–520. DOI: 10.15171/apb.2016.065.
5. Kaszuba M., McKnight D., Connah M. T. et al. Measuring sub nanometre sizes dynamic light scattering. *J Nanopart Res*. 2008;10:823–829.
6. Suhaimi S. H., Hasham R., Rosli N. A. Effects of formulation parameters on particle size and polydispersity index of orthosiphonstamineus loaded nanostructured lipid carrier. *Journal of advanced research in applied sciences and engineering technology*. 2015; 1(1): 36–39.
7. Baryshnikov A.Yu. Nanostructured liposomal systems as a means of delivery of anticancer drugs. *Vestnik RAMS*. 2012; 3: 23–30 (In Russ.).
8. Demina N. B., Skatkov S. A. Development strategies and biopharmaceutical aspects of drug delivery systems. *ROS. Chem. J. (J. ROS. Chem. About them. D.I. Mendeleev)*. 2012; LVI(3–4): 5–10 (In Russ.).
9. Oborotova N., Treshalina H., Bashakova Z. et al. Possible application of the new lipidocytostatic D-152 in different drug formulation. *Pharmaceutski vestnik, Ljubljana*. 1997;48:278–279.
10. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010; 27: 2569–2589. DOI: 10.1007/s11095-010-0233-4.
11. Babadzanjan L. K., Voitylov A. V., Vojtylov V. V., Trusov A. A. Analysis of polydispersity of macromolecular and nano-dispersed systems; electro-optical methods. *High molecular compounds, Series S*. 2010; 52(5): 1–12 (In Russ.).
12. 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; 377(1): 159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
13. Riaz M. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996; 19(1): 65–77.
14. Shanskaya A. I., Puchkova S. M., Yakovleva T. E. Liposomes – a promising form of drugs. *Medicine of extreme situations*. 2011; 3(37): 100–104 (In Russ.).
15. Sanarova E.V. Abstract of «Development and biopharmaceutical study of a new liposomal dosage form of tirosens for photodynamic therapy». 2013; 24 (In Russ.).
16. Krasnopolsky Yu. M., Stepanov A. E., Shvets V. I. et al. Lipid technological platform for the creation of new dosage forms and transport of active pharmaceutical substances. *Biopharmaceutical journal*. 2011; 3(2): 10–18 (In Russ.).
17. Abiyev R.Sh., Vasiliev M.P., Doilnitsyn V.A. Research of process of vacuum degassing of water in a vortex jet device. *Proceedings of the Spbsti(TU).I. Chemistry and chemical technology. Processes and devices*. 2015;28:64–69 (In Russ.).
18. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. М., 2015; 70–183 (In Russ.).

Разработка состава и технологии получения гранул омепразола в аппарате псевдоожиженного слоя

Н. В. Мазова^{1*}, А. Л. Марченко¹, И. Е. Смехова¹

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Мазова Наталья Владимировна. E-mail: natalia.mironcheva@pharminnotech.com

Статья получена: 15.04.2019. Статья принята к печати: 25.04.2019

Резюме

Введение. Исследование посвящено вопросам разработки состава и технологии гранул омепразола. Установлено, что самой оптимальной лекарственной формой для препаратов ингибиторов протонной помпы считается таблетка с системой множества пеллет (микрочастиц). В случае производства данных препаратов в микрогранулах частицы покрыты несколькими защитными оболочками. Для разработки микрогранул омепразола предложена технология наплаивания в аппарате псевдоожиженного слоя.

Цель. Получение в аппарате псевдоожиженного слоя покрытых кишечнорастворимой оболочкой микрогранул омепразола.

Материалы и методы. Для решения поставленной цели определены технологические характеристики полученных при различных режимах работы аппарата псевдоожиженного слоя гранулятов омепразола, такие как форма гранул, фракционный состав и насыпная плотность методами, описанными Государственной фармакопеей XIII издания.

Результаты и обсуждение. В результате исследования обоснован выбор полимеров для послойного нанесения в процессе гранулирования субстанции омепразола. Произведен подбор кишечнорастворимого полимера различных фирм производителей для обеспечения необходимого профиля высвобождения омепразола в организме человека. Выбран сополимер метакриловой кислоты – Kollicoat MAE 100 P. Особое внимание уделено получению кишечнорастворимых гранул омепразола правильной сферообразной формы с минимальной шероховатостью и улучшенной сыпучестью для дальнейшего таблетирования. С целью получения гранул омепразола сферообразной формы произведен подбор оптимального режима работы аппарата псевдоожиженного слоя для осуществления процесса нанесения кишечнорастворимого полимера. По итогам экспериментов определена зависимость качества фракционного состава и внешнего вида гранул омепразола от температуры, давления и скорости подачи полимера. Кроме того, установлено, что равномерность нанесения и толщина слоя нанесенного кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола зависят не только от скорости подачи полимера, но и от размера капель подаваемого раствора.

Заключение. Установлено, что на качество получаемых кишечнорастворимых гранул омепразола влияли такие факторы работы аппарата псевдоожиженного слоя, как: температура входящего воздуха в аппарате, давление воздуха на форсунку, давление воздуха на газораспределительную решетку аппарата, скорость подаваемого полимера, масса загрузки гранул, температура воздуха слоя гранул, длительность сушки гранул по окончании процесса нанесения кишечнорастворимого полимера.

Ключевые слова: ингибиторы протонной помпы, грануляция, аппарат псевдоожиженного слоя, кишечнорастворимые полимеры.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Мазова Н. В., Марченко А. Л., Смехова И. Е. Разработка состава и технологии получения гранул омепразола в аппарате псевдоожиженного слоя. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 74–79.

Research and Development of the Composition and Technology Receiving of Granules of Omeprazole in the Fluid Bed Apparatus

N. V. Mazova^{1*}, A. L. Marchenko¹, I. E. Smehova¹

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

*Corresponding author: Natalia V. Mazova. E-mail: natalia.mironcheva@pharminnotech.com

Received: 15.04.2019. Accepted: 25.04.2019

Abstract

Introduction. In this research is devoted to questions of development of structure and technology of granules of an omeprazole. It is established that the most optimal dosage form for medicines of inhibitors of a proton pump is considered to be the tablet with a multiple-unit pellets system (microparticles). In this case of the production of these medicines in the microgranules of a particle are covered with several protective covers. For development of microgranules of an omeprazole is offered the technology of lamination in the fluid bed apparatus.

Aim. To receive in the fluid bed apparatus of the microgranules of an omeprazole covered with the enteric cover.

Materials and methods. To solve this problem technical characteristics on the granulates of an omeprazole received at various operating modes of the fluid bed apparatus are defined such as form of granules, fractional structure and bulk density are determined by the methods described by the State Pharmacopeia of the XIII edition.

Results and discussion. As a result of a research the choice of polymers for layered deposition in the granulation process of a substance of omeprazole is substantiated. Produced selection of enteric polymer of various firms of producers is made for providing a necessary profile of release of an omeprazole in a human body. A copolymer of methacrylic acid – Kollicoat MAE 100 P is chosen. Special attention is paid to receiving the enteric granules of an omeprazole of the correct spherical form with minimum roughness and the improved flowability for further tabletting. For the purpose of receiving granules of an omeprazole of a spherical form selection of an optimum operating mode of the device of a fluid bed apparatus is made for implementation of process of applying the enteric polymer. Following the results of experiments the dependence of quality of fractional structure and appearance of granules of an omeprazole on temperature, pressure and feed rate of polymer is defined. Besides, it is established that the uniformity of application and thickness of a layer of the applied enteric polymer on granules of an omeprazole depend not only on the polymer feed rate, but also on the size of drops of the feed solution.

Conclusion. It is established that the quality of the granules of an omeprazole received the enteric polymer was affected by such factors of technological parameters of the fluid bed apparatus as: temperature of the entering air in the apparatus, the air pressure upon a nozzle, air pressure upon a gas-distributing grid of the apparatus, speed of the given polymer, a lot of loading of granules, air temperature of a layer of granules, duration of drying of granules upon termination of process of application of the enteric polymer.

Keywords: inhibitors of proton pump, granulation, fluid bed apparatus, enteric polymer.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Mazova N. V., Marchenko A. L., Smezhova I. E. Research and development of the composition and technology receiving of granules of omeprazole in the fluid bed apparatus. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 74–79.

ВВЕДЕНИЕ

Профилактика и лечение кислотозависимых заболеваний (КЗ) верхних отделов желудочно-кишечного тракта представляет собой важный комплекс медицинских мероприятий, направленных на укрепление здоровья населения [1, 2]. К наиболее эффективным лекарственным препаратам (ЛП) для лечения КЗ относятся препараты группы ингибиторов протонной помпы (ИПП) [3, 4]. Одним из популярных представителей данной группы является ее родоначальник – омепразол.

Оптимальной лекарственной формой препаратов ИПП считается таблетка с системой множества пеллет (микрочастиц) – multiple-unit pellets system (MUPS®) [5, 6]. Такие таблетки имеют ряд фармакокинетических и технологических преимуществ. В данных формах, в отличие от обычных таблеток, высвобождение действующего вещества (ДВ) происходит из каждой микрочастицы по отдельности и зависит от скорости эрозии таблетки [7]. Помимо этого быстрое перемещение микрочастиц из желудка в кишечник, благодаря малому размеру частиц, позволяет снизить вероятность местного раздражения и развития побочных эффектов, а также повысить биодоступность. Таблетки с микроформами снижают риск преждевременного высвобождения всей дозы ДВ сразу, а постепенная абсорбция ДВ обеспечивает равномерное достижение пиковой концентрации и наступление фармакологического эффекта [4].

В случае производства препаратов ИПП в виде MUPS ДВ в микрогранулах покрыты несколькими защитными оболочками, благодаря чему субстанции ИПП не подвергаются агрессивному действию желудочного сока, а также остаются стабильными в процессе хранения готовой лекарственной формы.

Широкое распространение получило производство микрогранул MUPS в аппаратах псевдооживленного слоя (ПОС) с использованием технологии насаивания. Основным преимуществом этого процесса является возможность объединения в одном аппарате не только смешения компонентов, грануляции и сушки гранулята, но и нанесение кишечнорастворимого полимера на полученные гранулы [8].

Операция покрытия кишечнорастворимым полимером в аппарате ПОС является наиболее сложным этапом в технологии изготовления таблетки MUPS, так

как от целостности и равномерности покрытия гранул зависит профиль растворения и высвобождение ДВ в организме человека. В связи с этим целью настоящего исследования было получение в аппарате ПОС покрытых кишечнорастворимой оболочкой микрогранул омепразола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись: субстанция омепразола магния фирмы Changzhou Truly Foreign Trade Co., Ltd, Китай и вспомогательные вещества: повидон К-30 (фирмы BASF, Германия), гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза Е6 VivaPharm фирмы JRS, Германия), гипролоза (гидроксипропилцеллюлоза) (Klucel EF Farm фирмы Ashland, США); сополимеры метакриловой кислоты этилакрилата 1:1: Kollicoat MAE 30 DP (30% дисперсия) (фирмы BASF, Германия); Eudragit L 100-55 (фирмы Evonik Industries, Германия); EudragitL 100-55 (фирмы Evonik Industries, Германия); Kollicoat MAE 100 P (фирмы BASF, Германия).

Оборудование: тестер для определения сыпучести Erweka GTL (Erweka GmbH, Германия), тестер определения насыпной плотности Erweka SVM 223 (Erweka GmbH, Германия), тестер определения истинности Erweka GTA 120 (Erweka GmbH, Германия), электронный анализатор влажности МА-30 (Россия), микроскоп медицинский Микмед-6 (Россия).

Для анализа полученных гранул использовали методики, приведенные в ГФ XIII: ОФС.1.2.1.0009.15 Оптическая микроскопия, ОФС.1.1.0015.15 Ситовой анализ, ОФС.1.4.2.0016.15 Степень сыпучести порошков, ОФС.1.4.2.0009.15 Однородность массы дозированных лекарственных форм, ОФС.1.4.2.0004.15 Истираемость таблеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка состава и технологии гранул омепразола

Для получения гранул омепразола в качестве приоритетной технологии была выбрана влажная грануляция, обеспечивающая однородность дозирования небольшой дозировки разрабатываемого препарата (20 мг).

На основе субстанции омепразола методом влажной грануляции в аппарате ПОС «Midi-Glatt» (фирмы Glatt, Германия) были изготовлены грануляты. Субстанцию омепразола увлажняли различными растворами: 10% раствором повидона K-30, 5% раствором гипромеллозы Е 6, 5% раствором гипролозы EF. При выборе увлажнителя оценивали внешний вид и основные технологические характеристики получаемых гранулятов, такие как сыпучесть и насыпную плотность, а также однородность распределения частиц по размерам.

Наиболее равномерного распределения частиц по размеру удалось добиться в случае использования в качестве увлажнителя 10 % водного раствора повидона K-30.

Покрывание гранул кишечнорастворимым полимером

Далее осуществляли подбор кишечнорастворимого полимера для гранул на основе повидона K-30. В аппарате ПОС «Midi – Glatt» проводили процесс нанесения различных кишечнорастворимых полимеров на ранее полученные гранулы омепразола с повидоном K-30.

Результаты анализа технологических характеристик гранулятов, покрытых различными кишечнорастворимыми полимерами, представлены в таблице 1.

Было установлено, что наиболее подходящим полимером для дальнейшего исследования является Kollicoat MAE 100 P. Так как данные гранулы обладали наиболее гладкой поверхностью, хорошей сыпучестью и высокой насыпной плотностью. Однако для дальнейшего таблетирования полученных кишечнорастворимых гранул необходимо было добиться лучшего качества гранул, а именно их сферообразной формы с минимальной шероховатостью и улучшенной сыпучестью.

В связи с этим проводили усовершенствование процесса нанесения данного полимера в аппарате ПОС. Был выполнен ряд экспериментов, в каждом из которых менялась одна из величин процесса нанесе-

ния кишечнорастворимого полимера на гранулы в аппарате ПОС «Midi – Glatt» при неизменных остальных величинах. Были выбраны следующие контролируемые параметры: температура входящего воздуха в аппарате, давление воздуха на форсунку в аппарате, давление воздуха на газораспределительную решетку аппарата, скорость подаваемого полимера.

1. Исследование влияния температуры входящего воздуха на процесс нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

Выбор температуры входящего воздуха вели в пределах $(50-65) \pm 1$ °C. Температура ниже 50 °C оказалась неприемлемой для проведения процессов грануляции или покрытия продуктов на основе субстанций ИПП, из-за их взаимодействия с влагой.

При более высокой температуре входящего воздуха $(63-65) \pm 1$ °C наблюдался неравномерный фракционный состав гранулята (встречались конгломераты), покрытые гранулы имели шероховатую поверхность, что приводило к снижению их насыпной плотности $(0,4 \pm 0,05$ г/мл), и, как следствие, сыпучести (рисунок 1).

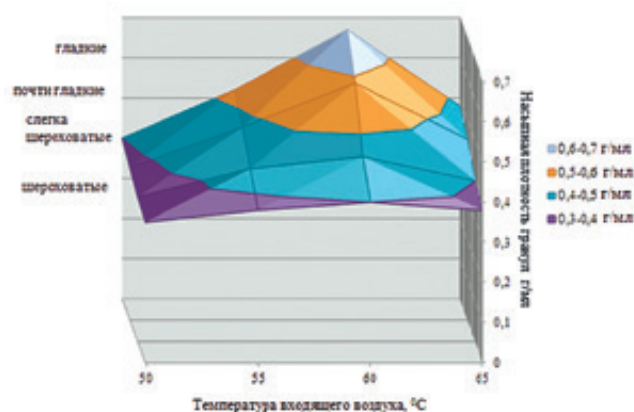


Рисунок 1. Зависимость насыпной плотности гранулята от температуры входящего воздуха в аппарате псевдоожиженного слоя

Figure 1. The dependence of the bulk density of the granulate from the temperature of the incoming air in the fluid bed apparatus

Таблица 1. Основные технологические характеристики гранул омепразола, покрытых различными кишечнорастворимыми полимерами

Table 1. The main technological characteristics of omeprazole granules coated with various enteric polymers

Наименование полимера	Фракционный состав, (% $\pm\sigma$)				Степень сыпучести	Угол естественного откоса ($^\circ\pm\sigma$), n=5	Насыпная плотность (г/мл $\pm\sigma$), n=5	Внешний вид частиц гранулята
	2–1 мм	1–0,5 мм	0,5–0,25 мм	0,25–0,1мм				
Kollicoat MAE 30 DP	2 \pm 1	49 \pm 1	35 \pm 1	14 \pm 1	удовлетворительная	41 \pm 1	0,46 \pm 0,10	Шарообразные, неправильной формы с шероховатой поверхностью
Eudragit L 100-55	32 \pm 1	43 \pm 1	20 \pm 1	5 \pm 1	хорошая	35 \pm 1	0,61 \pm 0,10	Шарообразные, неправильной формы с выпуклостями
Acryl-EZE II	18 \pm 1	62 \pm 1	14 \pm 1	6 \pm 1	хорошая	34 \pm 1	0,63 \pm 0,10	Шарообразные с воронками, шероховатые
Kollicoat MAE 100 P	5 \pm 1	85 \pm 1	8 \pm 1	2 \pm 1	хорошая	34 \pm 1	0,66 \pm 0,10	Шарообразные, слегка шероховатые

Установлено, что оптимальной температурой входящего воздуха являлось значение 60 ± 1 °С. Гранулы, полученные при данной температуре, отличались высокой насыпной плотностью ($(0,6-0,7) \pm 0,05$ г/мл), относительно гладкой поверхностью и хорошей сыпучестью ($6,6 \pm 0,5$ г/с).

2. Влияние давления входящего воздуха на решетку на процесс нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

Давление входящего воздуха на газораспределительную решетку аппарата ПОС непосредственно влияло на качество получаемого продукта. В связи с тем, что теплоноситель (входящий воздух) и раствор полимера из форсунки были направлены навстречу друг другу так, что происходило соударение струй, и в зоне орошения шел активный теплообмен, а обрабатываемый гранулят при этом непрерывно находился в движении, то объем проходящего воздуха значительно менял длительность процесса. С целью сокращения длительности этапа нанесения кишечнорастворимого полимера регулировали давление подаваемого горячего воздуха.

Было установлено, что расход воздуха менее $0,07 \pm 0,01$ бар не позволял слою частиц подниматься и кипеть, а при слишком сильной подаче воздуха (выше $0,16 \pm 0,01$ бар) происходил унос мелкой фракции еще непокрытого гранулята и повреждение гранул, покрытых полимером. Оптимальные значения давления подаваемого воздуха составили $(0,10-0,14) \pm 0,01$ бар (рисунок 2). Поддержание параметра «давление воздуха» в указанных пределах позволило сократить длительность процесса нанесения полимера с 60 до 45 мин.

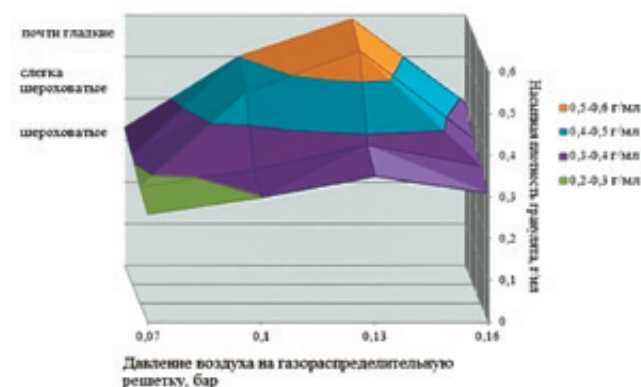


Рисунок 2. Зависимость насыпной плотности гранулята от давления воздуха на газораспределительную решетку в аппарате псевдооживленного слоя

Figure 2. The dependence of the bulk density of the granulate from the pressure air on gas distribution grid in the fluid bed apparatus

3. Влияние скорости подачи полимера на процесс нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

Для равномерного нанесения полимера на гранулы необходимо было достичь гидродинамическо-

го равновесия процесса. Для этой цели регулировали скорость подачи полимера. При скорости подачи менее $1,5 \pm 0,1$ мл/мин наблюдали медленный прирост массы гранул, их поверхность пересыхала, становилась шероховатой, покрывалась неравномерно. При скорости более $2,4 \pm 0,1$ мл/мин гранулы налипали на стенки и решетку аппарата ПОС, частицы переувлажнялись и слипались.

Лучшая сыпучесть и правильная форма гранул и их оптимальный фракционный состав, а также высокая насыпная плотность ($(0,5-0,7) \pm 0,01$ г/мл) была у гранул, покрытых при скорости $(1,8-2,1) \pm 0,1$ мл/мин (рисунок 3).

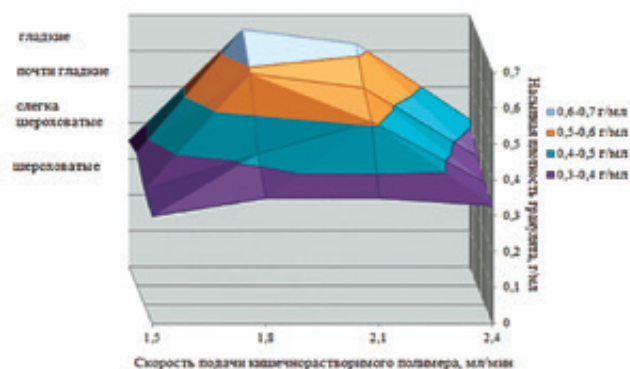


Рисунок 3. Зависимость насыпной плотности гранулята от скорости подачи кишечнорастворимого полимера в аппарате псевдооживленного слоя

Figure 3. The dependence of the bulk density of the granulate from feed rate enteric polymer in the fluid bed apparatus

4. Влияние давления подаваемого воздуха на форсунку на процесс нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

Было установлено, что равномерность нанесения и толщина слоя нанесенного полимера на гранулы зависели не только от скорости подачи полимера, но и от размера капель подаваемого раствора. Величину капель меняли путем регулирования давления воздуха, подаваемого на форсунку.

При значениях давления сжатого воздуха на форсунку менее $0,7 \pm 0,01$ бар получали крупные капли, гранулы переувлажнялись, имели неоднородный фракционный состав. Увеличение давления в интервале $(0,9-1,0) \pm 0,01$ бар приводило к улучшению технологических характеристик гранулята (сыпучесть и насыпную массу). При высоких значениях давления воздуха на форсунку (более $1,2 \pm 0,01$ бара) размер капли был слишком мелким, наблюдалось пересушивание гранулята. Не было необходимого прироста массы, так как капли высыхали, не достигнув поверхности гранул, и уносились из камеры аппарата ПОС. Установлено, что оптимальное значения давления сжатого воздуха, подаваемого на форсунку, должно находиться в интервале $(1,0-1,2) \pm 0,01$ бар (рисунок 4).

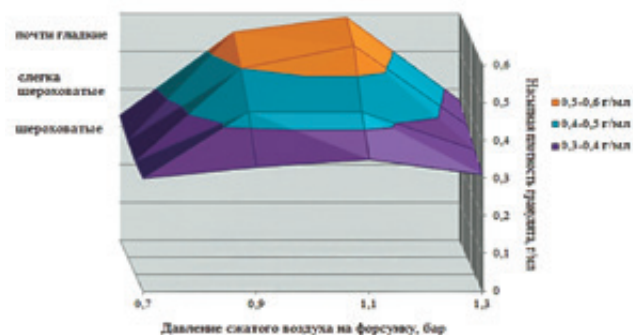


Рисунок 4. Зависимость насыпной плотности гранулята от давления сжатого воздуха, подаваемого на форсунку в аппарате псевдоожиженного слоя

Figure 4. The dependence of the bulk density of the granulate from pressure of compressed air supplied to the nozzle in the fluid bed apparatus

5. Влияние дополнительных параметров на процесс нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

Установлено, что кроме указанных выше технологических параметров работы аппарата ПОС, на качество получаемых гранул влияли следующие факторы:

- масса загрузки гранул для покрытия в аппарат ПОС. При загрузке в рабочее пространство камеры аппарата массы гранул менее 100 г процесс проходил неэффективно: 10–15% полимера попадало на стенки камеры аппарата, гранулы покрывались неравномерно или не покрывались вообще. Наблюдался неоднородный фракционный состав, много пылевидной фракции. При загрузке массы гранул более 300 г качество покрытия гранул также было неудовлетворительным. Гранулы перемешивались большими порциями, часть переувлажнялась, в то время как другая была пересушена. Таким образом, рациональный объем загрузки в аппарате ПОС «Midi-Glatt» для процесса нанесения полимера на гранулы омепразола составил $(150–250) \pm 2$ г;
- температура воздуха слоя гранул. Экспериментально было установлено, что регулирование температуры слоя гранул наряду с контролем температуры входящего воздуха, позволило получить продукт хорошего качества. Оптимальные значения температуры слоя гранул составили $(32–38) \pm 0,5$ °C;
- длительность сушки гранул по окончании процесса нанесения кишечнорастворимого полимера. Сушка гранул, покрытых полимером, проводилась при температуре входящего воздуха 55 °C. Длительность сушки контролировали путем измерения остаточной влаги в гранулах после проведения процесса нанесения полимера на влагомере при температуре 65 °C. Оптимальное значение остаточной влаги в гранулах составило 1,5–2,0%. При меньших значе-

ниях гранулы становились хрупкими и разрушались, при больших – имели склонность к залипанию при таблетировании. Для получения гранул с заданным количеством остаточной влаги было установлено время сушки 5–7 мин.

Таким образом, экспериментальным путем были получены оптимальные параметры процесса нанесения кишечнорастворимого полимера Kollicoat MA 100 P на гранулы на основе субстанции омепразола (таблица 2).

Таблица 2. Оптимальные параметры стадии нанесения кишечнорастворимого полимера Kollicoat MAE 100 P на гранулы на основе омепразола

Table 2. Optimal parameters of the stage of application of the enteric polymer Kollicoat MAE 100 P to omeprazole granules

Наименование параметра, единицы измерения	Значение параметра
Температура входящего воздуха, °C	58–63
Температура слоя гранул, °C	32–38
Давление входящего воздуха на решетку, бар	0,10–0,14
Давление воздуха на форсунку, бар	1,0–1,2
Скорость подачи полимера, мл/мин	1,8–2,1
Время сушки, мин	5–7
Потеря в массе при высушивании, %	1,5–2,0
Масса загрузки, г	150–250

Показатели качества гранул омепразола, полученных при разработанном режиме нанесения полимера, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Основные технологические характеристики гранул омепразола, покрытых кишечнорастворимым полимером Kollicoat MAE 100 P при оптимальных условиях работы в аппарате псевдоожиженного слоя

Table 3. The main technological characteristics of omeprazole granules coated enteric polymer Kollicoat MAE 100 P under optimal working conditions in the fluid bed apparatus

Показатели качества гранулята		Результаты анализа
Фракционный состав, (%±σ)	1,0–2,0 мм	7±1
	0,5–1,0 мм	89±1
	0,25–0,5 мм	4±1
	0,1–0,25 мм	–
Средняя масса гранулы и отклонение от средней массы, (мг±σ), n=10		16,20±0,03
Истираемость (прочность на истирание) (%±σ), n=5		1,87±0,03
Угол естественного откоса (°±σ), n=5		31±1
Степень сыпучести		Хорошая
Сыпучесть, (г/с±σ), n=5		6,9±0,1
Насыпная плотность (г/мл±σ), n=5		0,78±0,02
Внешний вид частиц гранулята		Шарообразные с почти гладкой поверхностью

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили получить кишечнорастворимые микрогранулы омепразола с использованием двух различных полимеров: водорастворимого повидона К-30 в составе гранул и кишечнорастворимого сополимера метакриловой кислоты Kollicoat MAE 100 P в составе покрытия полученных гранул. Были установлены оптимальные параметры работы лабораторной установки псевдооживленного слоя для проведения процесса нанесения кишечнорастворимого полимера на гранулы омепразола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маев И. В., Вьючнова Е. С., Щекина М. И. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь – болезнь XXI века. *Лечащий Врач*. 2004; 4: 10–14.
2. Warrington S., Baisley K., Dunn K., Boyce M., Morocutti A. Effects of single doses of rabeprazole 20 mg and esomeprazole 40 mg on 24-h intragastric pH in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006; 62: 685–691. DOI: 10.1007/s00228-006-0148-5.
3. Платошкин Э. Н. Ингибиторы протонной помпы – эталон лечения кислотозависимых заболеваний. *Медицинские новости*. 2007; 10: 25–30.
4. Dean L. Comparing Proton Pump Inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 19(6): 417.
5. Могилук В. В. Пероральные кишечнорастворимые лекарственные формы. *Провизор*. 2009; 6: 45–51.
6. Могилук В. В. Мультипартикулярные таблетки. *Фармацевтическая отрасль*. 2014; 2 (43): 36–39.
7. Леонова М. В. Белоусов Ю. Б. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки. М.: *Литтера*. 2011; 656.
8. Padhee K., Chowdhary K. A., Pattnaik S. N., Sahoo S. K., Pathak N. Design and development of Multiple-Unit, Extended release drug delivery system of Verapamil HCL by Pelletization Technique. *Int. J. Drug Dev. & Res*. 2011; 3(3): 118–125.

REFERENCE

1. Maev I. V., Vuchnova E. S., Scekina M. I. Gastroesophageal reflux disease is a disease of the XXI century. *LechashchiyVrach – Attending doctor*. 2004; 4: 10–14 (in Russ.).
2. Warrington S., Baisley K., Dunn K., Boyce M., Morocutti A. Effects of single doses of rabeprazole 20 mg and esomeprazole 40 mg on 24-h intragastric pH in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006; 62: 685–691. DOI: 10.1007/s00228-006-0148-5.
3. Platoshkin E. N. Inhibitors of a proton pump – standard of treatment of acid-related diseases. *Medicinskienovosti – Medical news*. 2007; 10: 25–30 (in Russ.).
4. Dean L. Comparing Proton Pump Inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 19(6): 417.
5. Mogiluk V. V. Oral enteric dosage forms. *Provisor – Pharmacist*. 2009; 6: 45–51 (in Russ.).
6. Mogiluk V. V. Multiparticle tablets. *Farmaceuticheskaia Otrasa – Pharmaceutical industry*. 2014; 2 (43): 36–39 (in Russ.).
7. Leonova M. V., Belousov U. B. Modified Release Dosage Forms and Delivery System. Moscow: *Littera*. 2011: 656 (in Russ.).
8. Padhee K., Chowdhary K. A., Pattnaik S. N., Sahoo S. K., Pathak N. Design and development of Multiple-Unit, Extended release drug delivery system of Verapamil HCL by Pelletization Technique. *Int. J. Drug Dev. & Res*. 2011; 3(3): 118–125.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-80-86
УДК 615.322; 547.972.2].074(571.15)

Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края

Г. Р. Кутателадзе^{1*}, Л. М. Федосеева¹

¹ – ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 656038, Россия, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40

*Контактное лицо: Кутателадзе Георгий Родионович. E-mail: goha-kut@mail.ru

Статья получена: 12.12.2018. Статья принята к печати: 21.01.2019

Резюме

Введение. Щавель кислый (*Rumex acetosa* L.) – двулетнее травянистое растение из семейства Гречишные (*Polygonaceae* L.). Ранее изучен состав фенольных соединений спиртового извлечения и эфирной, этилацетатной, бутанольной фракций щавеля кислого травы и обнаружены флавоноиды группы флавонола. Из литературы известно, что одной из групп биологически активных соединений, обладающих противовоспалительным действием, являются флавоноиды. Следовательно, актуальной задачей является оценка количественного содержания флавоноидов в щавеля кислого траве.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.

Материалы и методы. Комплекс флавоноидов травы щавеля кислого включает рутин, поэтому в качестве стандарта для расчетов суммы флавоноидов использовали стандартный образец (СО) рутина. Готовили спиртовое извлечение щавеля кислого травы и раствор СО рутина. Проводили реакцию комплексообразования с алюминия хлоридом. Полученные растворы исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Сравнивали спектральные характеристики исследуемого и стандартного образцов. Изучали влияние условий экстракции на выход флавоноидов из сырья: экстрагент, размер частиц сырья, соотношение «сырье – экстрагент», температура, кратность и продолжительность экстракции. В качестве экстрагента использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (20%, 40%, 70%, 90%). Подбирали оптимальные условия для проведения реакции комплексообразования (время реакции комплексообразования, соотношение «аликвота – алюминия хлорида раствор спиртовой»). Проводили валидацию методики согласно ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIII издания и общепринятым методикам по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

Результаты и обсуждение. Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из сырья (трехкратная экстракция спиртом этиловым 70% на водяной бане, соотношение «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 30 минут, размер частиц сырья – 2,0 мм). Подобраны условия проведения реакции комплексообразования (соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой» – 1:2,5, комплексообразователь – раствор алюминия хлорида 5% спиртовой, появление устойчивой окраски раствора через 40 минут). При проведении валидации разработанной методики установлено, что валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости. При анализе сырья, заготовленного на территории Алтайского края в разные годы, установлено, что содержание флавоноидов в щавеля кислого траве колеблется от 0,596 до 0,632%.

Заключение. Определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из сырья, подобраны условия проведения реакции комплексообразования, проведена валидация методики. Установлено количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин в щавеля кислого траве, заготовленном на территории Алтайского края в разные годы.

Ключевые слова: щавель кислый, трава, количественное определение, флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, рутин, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Кутателадзе Г. Р., Федосеева Л. М. Исследования по разработке и валидации методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве, заготовленной на территории алтайского края. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 80–86.

Research in the Development and Validation of the Method of Quantitative Determination of Flavonoids in the Common Sorrel Herba, Gathered in the Altai Territory

G. R. Kutateladze^{1*}, L. M. Fedoseeva¹

¹ – Altai State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 40, Lenina str., Barnaul, 656038, Russia

*Corresponding author: Georgij R. Kutateladze. E-mail: goha-kut@mail.ru

Received: 12.12.2018. Accepted: 21.01.2019

Abstract

Introduction. Common sorrel (*Rumex acetosa* L.) is a biennial herb from the Buckwheat family (*Polygonaceae* L.). In our previously studies of phenolic compounds composition of alcohol extraction and ethereal, ethyl acetate, butanol fractions of common sorrel herba and flavonoids of the flavonol group was found. From the literature sources it is known that flavonoids are one of the groups of biologically active compounds with anti-inflammatory action. In this regard, the actual task is to assess the quantitative content of flavonoids in common sorrel herba.

Aim. Is the development and validation of a method for the quantitative determination of flavonoids in common sorrel herba.

Materials and methods. It has been established that the flavonoid complex of common sorrel herba includes rutin, therefore, the reference sample (RS) rutin was used as a standard for calculating the amount of flavonoids. Alcohol extract of common sorrel herba and a solution of rutin RS were prepared. The complexation reaction with aluminum chloride was carried out. The resulting solutions were investigated by the method of differential spectrophotometry. The spectral characteristics of the test and standard samples were compared. Then we studied the effect of extraction conditions on the yield of flavonoids from the raw material: the extractant, the particle size of the raw material, the ratio of «raw material – extractant», temperature, frequency and duration of extraction. Purified water and ethyl alcohol of various concentrations (20%, 40%, 70%, 90%) were used as the extractant. Next, carried out the selection of the optimal conditions for the complexation reaction (the complexation reaction time, the ratio of «aliquot – aluminum chloride alcohol solution»). The method was validated according to GPM.1.1.0012.15 of the State Pharmacopoeia (SF) XIII edition and generally accepted methods for the following indicators: specificity, analytical field, linearity, accuracy, precision.

Results and discussion. The optimal parameters for extracting flavonoids from raw materials were determined (threefold extraction with ethyl alcohol 70% in a water bath, the ratio of «raw material – extractant» – 1:30 for 30 minutes, the particle size of the raw material – 2.0 mm). The conditions for the complexation reaction were selected (the ratio «aliquot: aluminum chloride alcohol solution» – 1: 2.5, the complexing agent – aluminum chloride solution 5% alcohol, the appearance of a stable solution color after 40 minutes). When carrying out the validation of the developed method, it was established that the validation characteristics under study are within the acceptance criteria. When analyzing the raw materials harvested in the Altai Territory in different years, it was found that the content of flavonoids in common sorrel herba ranges from 0,596 to 0,632%.

Conclusion. The optimal parameters of extraction of flavonoids from raw materials were determined, the conditions for the complexation reaction were selected, and the developed method was validated. The quantitative content of flavonoids in terms of rutin in sorrel sour grass harvested in the Altai Territory in different years has been established.

Keywords: common sorrel, herba, quantitative determination, flavonoids, differential spectrophotometry, rutin, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Kutateladze G. R., Fedoseeva L. M. Research in the development and validation of the method of quantitative determination of flavonoids in the common sorrel herba, gathered in the altai territory. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 80–86.

ВВЕДЕНИЕ

Щавель кислый (*Rumex acetosa* L.) – двулетнее травянистое растение из семейства Гречишные (*Polygonaceae* L.). Трава являлась фармакопейным растением на территории Англии и использовалась как противовоспалительное средство [10, 11, 13, 14]. Комплекс биологически активных соединений (БАС) щавеля кислого травы разнообразен и включает флавоноиды, фенолокислоты, конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества, органические кислоты, что свидетельствует о целесообразности изучения и внедрения данного вида сырья в научную медицину РФ [9, 12, 15].

Ранее нами изучен состав фенольных соединений спиртового извлечения и эфирной, этилацетатной, бутанольной фракций щавеля кислого травы и обнаружены фенолокислоты, флавоноиды группы флавонола, антраценпроизводные группы хризацина [7]. Из литературных данных известно, что одной из групп биологически активных соединений, обладающих противовоспалительным действием, являются флавоноиды [1, 4].

В связи с вышесказанным, является актуальным провести определение количественного содержания флавоноидов в траве щавеля кислого.

Цель – определение условий экстракции флавоноидов, разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – щавеля кислого трава, заготовленная на территории Алтайского края в 2016–2018 гг. в фазу цветения.

Установлено, что комплекс флавоноидов травы щавеля кислого включает рутин, поэтому в качестве стандарта для расчетов суммы флавоноидов использовали стандартный образец (СО) рутина («Sigma-Aldrich», каталожный номер R5143, содержание рутина $\geq 94\%$ (HPLC), годен до 03.2019) [7]. Готовили спиртовое извлечение щавеля кислого травы и раствор стандартного образца рутина. Проводили реакцию комплексо-

образования с раствором алюминия хлорида 5% спиртовым (ч.д.а., ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Полученные растворы исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Сравнивали спектральные характеристики исследуемого и стандартного образцов.

Целесообразность использования данного метода объясняется характером дифференциального спектра комплексов флавоноидов с селективными максимумами поглощения при 390–410 нм. Другие группы фенольных соединений не дают характерных максимумов в данной области. При использовании в качестве раствора сравнения раствора извлечения без добавления реактивов исключается влияние сопутствующих фенольных соединений на результаты анализа [5, 6]. Для предотвращения возможности ионизации флавоноидов к исследуемым пробам добавляли кислоты уксусной раствор 3% (х.ч., ЗАО «ВЕКТРОН», Россия) [6].

Оптическую плотность исследуемых растворов, растворов стандартного образца рутина измеряли на спектрофотометре «Schimadzu UV-mini 1240» (Япония) при длине волны 410 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексного соединения рутина с алюминия хлоридом.

Далее изучали влияние условий экстракции на выход флавоноидов из травы щавеля кислого: экстрагент, размер частиц сырья, соотношение «сырье – экстрагент», температура, кратность и продолжительность экстракции. В качестве экстрагента использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (20, 40, 70, 90%). В предыдущих исследованиях нами установлено, что в щавеля кислого траве преобладают гликозиды флавоноидов [7]. Известно, что с увеличением концентрации спирт этиловый в меньшей степени извлекает гликозиды флавоноидов, в большей степени – агликоны. По этой причине этиловый 95% для исследований не использовался.

Затем подбирали оптимальные условия для проведения реакции комплексообразования (время реакции комплексообразования, соотношение «аликвота – алюминия хлорида раствор спиртовой»).

Проводили валидацию методики согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи XIII издания и общепри-

нятым методикам по следующим показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность [2, 3, 8].

Специфичность (селективность) методики определяли путем анализа дифференциальных спектров поглощения раствора стандартного образца, извлечения из травы щавеля кислого и раствора «плацебо». Критерием приемлемости специфичности методики считается совпадение максимумов поглощения раствора СО и извлечения из травы щавеля кислого и отсутствием максимумов в спектре поглощения раствора «плацебо».

Линейность методики устанавливали путем анализа растворов 11 уровней концентрации (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300%) от теоретического содержания суммы флавоноидов (в пересчете на рутин, %) в щавеля кислого траве.

Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов, составляли уравнение регрессии. Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции (r), который должен быть не менее 0,99. При условии, что его значение близко к единице, то совокупность анализируемых данных можно описать прямой линией.

Аналитическую область методики определяли по интервалу экспериментальных данных полученных и удовлетворяющих линейную модель. Критерием приемлемости является диапазон применения аналитической методики, который должен составлять 80–120% от номинального содержания флавоноидов в сырье.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в извлечениях, полученных путем добавления необходимого количества раствор СО рутин 0,05%.

Критерием приемлемости правильности методики является открываемость (R , %), скорректированная на 100%, средняя величина которой должна быть в пределах $100 \pm 5\%$, относительное стандартное отклонение (RSD , %).

Повторяемость (сходимость) методики проверяли путем приготовления спиртового извлечения травы щавеля кислого из 6 навесок сырья в пределах короткого промежутка времени, с применением одинакового набора реактивов и с участием одного и того же исследователя. Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность определяли, как описано выше в условиях той же лаборатории, но в разные дни и с участием разных исследователей. Критерий приемлемости выражается величиной относительного стандартного отклонения (RSD , %), которое не должно превышать 2% и 5% соответственно.

Статистическую обработку результатов исследований провели согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ XIII с использованием ПО «Microsoft Excel», статистического пакета «Statistica 7.0» [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе дифференциальных спектров поглощения спиртового извлечения щавеля кислого травы и рутина с алюминия хлорида раствором спиртовым установлено, что полученные спектры совпадали с максимумом поглощения при 409 нм (рисунок 1).

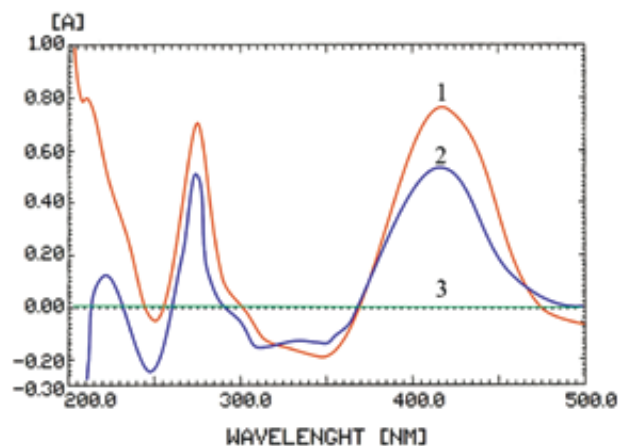


Рисунок 1. Дифференциальный УФ-спектр комплекса спиртового извлечения из травы щавеля кислого (2) и СО рутина (1) с алюминия хлоридом; УФ – спектр раствора «плацебо» (3). Примечание: Wavelength (nm) – длина волны (нм), [A] – оптическая плотность

Figure 1. Alcoholic extraction from the common sorrel herb (2) and rutin RS (1) with aluminum chloride complex's differential UV spectrum; The UV spectrum of the placebo solution (3)

В ходе подбора оптимального экстрагента для извлечения суммы флавоноидов щавеля кислого травы использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации (от 20 до 90%). Экстракцию проводили с обратным холодильником на кипящей водяной бане трижды по 30 мин. Далее полученные извлечения исследовали методом дифференциальной спектрофотометрии. Выход флавоноидов в пересчете на рутин при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70% составил 0,63%. Данный растворитель применяли для дальнейших исследований.

Установлено, что наиболее полная экстракция флавоноидов из щавеля кислого травы достигается при трехкратной экстракции спиртом этиловым 70% на водяной бане ($t^{\circ}C=100$) при соотношении «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 30 минут со степенью измельчения сырья 2,0 мм (таблица 1).

Оптимальные условия комплексообразования: соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой» – 1:2,5 при использовании в качестве комплексообразователя раствора алюминия хлорида 5% спиртового, появление устойчивой окраски раствора через 40 минут (таблица 2).

На основании проведенных исследований разработана методика количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве:

Таблица 1. Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из щавеля кислого травы

Table 1. The influence of various factors on the completeness of the extraction of flavonoids from common sorrel herb

Экстрагент	Размер частиц сырья, мм	Соотношение «сырье-экстрагент»	Продолжительность экстракции, мин	Кратность экстракции	Температура, °С	Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин), %		
						$\bar{x} \pm \Delta x$	S \bar{x}	ε, %
Экстрагент								
Вода очищенная	1–2	1:30	30	3	100	0,450±0,012	0,010	2,67
Спирт этиловый 20%						0,492±0,008	0,012	1,63
Спирт этиловый 40%						0,591±0,005	0,042	0,85
Спирт этиловый 70%						0,630±0,004	0,046	0,63
Спирт этиловый 90%						0,560±0,007	0,053	1,25
Размер частиц сырья								
Спирт этиловый 70%	0,1–0,5	1:30	30	3	100	0,451±0,004	0,051	0,89
	1–2					0,630±0,005	0,053	0,79
	2,5–3					0,592±0,004	0,047	0,67
	3,5–5					0,542±0,008	0,058	1,47
Соотношение «сырье – экстрагент»								
Спирт этиловый 70%	1 – 2	1:20	30	3	100	0,570±0,008	0,054	1,40
		1:30				0,631±0,004	0,054	0,63
		1:50				0,601±0,010	0,075	1,66
		1:70				0,560±0,009	0,068	1,61
		1:90				0,541±0,007	0,048	1,29
Температура								
Спирт этиловый 70%	1 – 2	1:30	30	3	20	0,290±0,003	0,044	1,03
					40	0,314±0,007	0,065	2,23
					60	0,436±0,007	0,032	1,60
					80	0,659±0,005	0,076	0,76
					100	0,630±0,006	0,065	0,95
Кратность экстракции								
Спирт этиловый 70%	1 – 2	1:30	30	1	100	0,531±0,009	0,075	1,69
				2		0,540±0,008	0,074	1,48
				3		0,631±0,006	0,043	0,95
				4		0,630±0,010	0,042	0,96
Продолжительность экстракции								
Спирт этиловый 70%	1 – 2	1:30	20	3	100	0,560±0,006	0,064	1,07
			30			0,632±0,010	0,046	1,58
			40			0,658±0,009	0,056	1,37
			50			0,630±0,007	0,048	1,11
			60			0,630±0,006	0,054	0,95

Около 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито размером 2 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически перемешивая. Охлажденное извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попадали на фильтр. В колбу для экстрагирования прибавляют 30 мл спирта этилового 70%. Экстракцию повторяют еще дважды в описанных выше условиях, фильтруют

извлечение в ту же мерную колбу. После охлаждения объем извлечения доводят тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А испытуемого раствора). В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2,0 мл раствора А испытуемого раствора, 5 мл алюминия хлорида раствора 5% спиртового, доводят объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора). Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, со-

стоящий из 2 мл раствора А испытуемого раствора и 1 мл кислоты уксусной раствора 3%, доведенный спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО рутин.

Таблица 2. Влияние различных факторов на полноту образования комплекса флавоноидов щавеля кислого травы с алюминия хлоридом

Table 2. The influence of various factors on the completeness of the formation of a complex of flavonoids in common sorrel herb with aluminum chloride

Условие проведения реакции		Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин), %		
		$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	S \bar{x}	ε , %
Концентрация алюминия хлорида раствора спиртового, %	2	0,543 \pm 0,015	0,056	2,76
	3	0,550 \pm 0,007	0,061	1,27
	4	0,581 \pm 0,015	0,075	2,58
	5	0,630 \pm 0,004	0,054	0,63
Соотношение «аликвота : алюминия хлорида раствор спиртовой»	1:0,5	0,411 \pm 0,010	0,051	2,43
	1:1	0,450 \pm 0,015	0,042	3,33
	1:1,5	0,511 \pm 0,008	0,038	1,56
	1:2	0,590 \pm 0,007	0,053	1,19
	1:2,5	0,630 \pm 0,005	0,037	0,79
Продолжительность комплексообразования, мин	20	0,524 \pm 0,010	0,098	1,91
	30	0,598 \pm 0,004	0,086	0,67
	40	0,630 \pm 0,004	0,075	0,63
	50	0,630 \pm 0,010	0,100	1,59
	60	0,630 \pm 0,008	0,064	1,27

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где А – оптическая плотность раствор Б испытуемого раствора; А₀ – оптическая плотность раствора Б СО рутин; а – навеска сырья, г; а₀ – навеска СО рутин, г; Р – содержание основного вещества в СО рутин, %; W – влажность сырья, %.

Разработка методики количественного определения предусматривает проведение валидации. При проведении валидации методики количественного определения суммы флавоноидов щавеля кислого травы оценивали следующие показатели: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность.

В процессе определения специфичности снимали дифференциальные спектры продуктов реакции флавоноидов исследуемого извлечения, СО рутин с алюминия хлоридом и спектры поглощения раствора «плацебо» (спирт этиловый 70%).

Специфичность методики подтверждалась совпадением максимумов поглощения раствора СО и извлечения из травы щавеля кислого (имеют максимумы

поглощения при длине волны 410 нм), а также отсутствием максимумов в спектре поглощения раствора «плацебо» (рисунок 1).

Для оценки линейности отбирали аликвоты извлечения объемом 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 мл. Определяли количественное содержание суммы флавоноидов в полученных растворах в соответствии с валидируемой методикой.

Строили график зависимости оптической плотности растворов от количественного содержания суммы флавоноидов (рисунок 2). Уравнение регрессии графика имеет следующий вид: $y = 0,1829x - 0,0007$. Значение коэффициента корреляции стремится к единице ($r = 0,9997$), что свидетельствует о наличии линейной зависимости оптической плотности от концентрации флавоноидов в исследуемых растворах в пределах аналитической области методики.

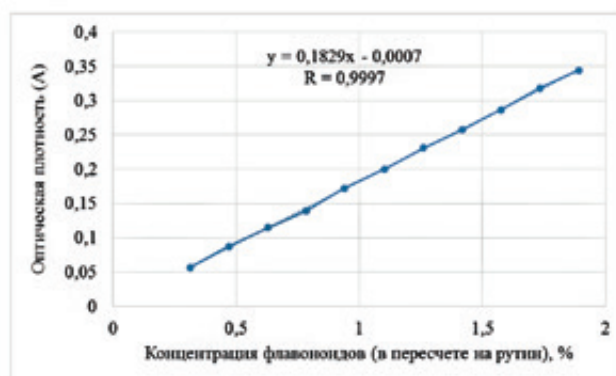


Рисунок 2. График зависимости оптической плотности от содержания суммы флавоноидов (в пересчете на рутин, %) в извлечении из травы щавеля кислого

Figure 2. Graph of absorbance in dependence to flavonoid content (in terms of rutin,%) in extracting of common sorrel herb

Аналитическая область методики находится в пределах линейной зависимости и составляет 50–300% от номинального содержания флавоноидов в сырье, что удовлетворяет рефератным значениям (80–120%)

Для оценки правильности методики определяли количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в растворах, полученных с помощью добавления 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл раствора СО рутин к исследуемому извлечению. На каждом уровне концентраций определяли количественное содержание суммы флавоноидов в трёх пробах в соответствии с валидируемой методикой. Границы открываемости методики находятся в пределах 98,83–100,20%, средняя величина открываемости составила 99,39%. Относительное стандартное отклонение составляет 0,35%, что свидетельствует о высокой степени соответствия между значением расчётного и полученного содержания суммы флавоноидов в исследуемых образцах (таблица 3).

Таблица 3. Результат оценки правильности методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии

Table 3. The result of the accuracy assessment of the method for quantitative determination of flavonoids in common sorrel herb by differential spectrophotometry

№ п/п	Исходное содержание рутина, мг	Добавлено СО рутина, мг	Ожидаемое содержание, мг	Полученное содержание, мг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	0,630	0,120	0,7560	0,7470	98,88	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 99,39 \pm 0,35$; $S\bar{x} = 0,16\%$; $RSD = 0,35\%$
2				0,7550	99,84	
3				0,7540	99,68	
4	0,630	0,252	0,8820	0,8720	98,83	
5				0,8760	99,36	
6				0,8770	99,47	
7	0,630	0,378	1,008	1,0100	100,20	
8				0,9970	98,91	
9				1,0020	99,40	

Прецизионность валидируемой методики оценивали в двух вариантах. Повторяемость (сходимость) методики проверяли путем приготовления спиртового извлечения травы щавеля кислого из 6 навесок сырья в соответствии с валидируемой методикой, в пределах короткого промежутка времени, с применением одинакового набора реактивов и с участием одного и того же исследователя. Внутрिलाбораторную (промежуточную) прецизионность определяли, как описано выше в условиях той же лаборатории, но в разные дни и с участием разных исследователей.

Из данных таблицы 4 следует, что величина относительного стандартного отклонения результатов при оценке повторяемости равняется 1,1% (не превышает 2%), при оценке промежуточной прецизионности – 0,71% (не превышает 5%), что свидетельствует о прецизионности методики.

В ходе исследования установлено, что методика количественного определения специфична, зависимость аналитического сигнала (оптической плотности) от концентрации флавоноидов линейна, величины показателей прецизионности и правильности не превышают рекомендуемых значений валидности методики.

При анализе сырья, заготовленного на территории Алтайского края в разные годы, по разработанной методике установлено, что содержание флавоноидов в щавеля кислого траве колеблется от 0,596 до 0,632% (таблица 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Подобраны оптимальные условия и предложена методика определения суммы флавоноидов с использованием в качестве стандартного образца рутина. В ходе работы установлено, что наиболее полная экстракция флавоноидов из щавеля кислого травы достигается при трехкратной экстракции спиртом

этиловым 70%, соотношение «сырье – экстрагент» – 1:30 в течении 40 минут с размером частиц сырья 2,0 мм.

Таблица 4. Результат оценки прецизионности методики количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии

Table 4. The result of the assessment of the precision of the method for the quantitative determination of flavonoids in common sorrel herb by the method of differential spectrophotometry

№ п/п	Масса навески	Исследователь	Содержание флавоноидов (в пересчете на рутин), %	Метрологические характеристики
Повторяемость (сходимость)				
1	1,221	№1	0,616	P=95%, n=6, f=5, t(P,f) = 2,57, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,624 \pm 0,01\%$, S \bar{x} =0,007, ε=1,6%, RSD = 1,1%
2	1,095	№1	0,621	
3	1,324	№1	0,627	
4	1,215	№1	0,635	
5	1,078	№1	0,618	
6	1,134	№1	0,624	
Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность				
7	0,998	№1	0,628	P=95%, n=6, f=5, t(P,f)=2,57, $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,628 \pm 0,005\%$, S \bar{x} =0,004, ε=0,80%, RSD = 0,71%
8	1,102	№1	0,634	
9	1,351	№1	0,631	
10	1,062	№2	0,627	
11	1,265	№2	0,629	
12	0,984	№2	0,621	

Таблица 5. Количественное содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин и на абсолютно сухое сырье, %) в щавеля кислого траве в разные годы заготовленной на территории Алтайского края

Table 5. The quantitative content of the flavonoids amount (in terms of rutin and on basis of absolutely dry raw materials, %) in common sorrel herb, harvested in the Altai Territory in different years

Год заготовки	Метрологические характеристики ($n=5$; $P=95\%$; $tp=2,78$)		
	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$S\bar{x}$	ϵ , %
2016	$0,630 \pm 0,012$	0,065	1,90
2017	$0,632 \pm 0,010$	0,070	1,58
2018	$0,596 \pm 0,015$	0,084	2,51

2. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в щавеля кислого траве методом дифференциальной спектрофотометрии. Доказано, что предложенная методика количественного определения флавоноидов валидна по показателям специфичность, линейность, аналитическая область методики, прецизионность, правильность и может быть использована для количественного определения флавоноидов в щавеля кислого траве.
3. Сумма флавоноидов (в пересчете на рутин) в щавеля кислого траве, заготовленной на территории Алтайского края имеет сопоставимые значения и составляет 0,596–0,632%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарова О. В., Галактионова Л. П. Флавоноиды: механизм противовоспалительного действия. *Химия растительного сырья*. 2012; 4: 61–78.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. М., 2015; 1: 1470. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/
3. Евдокимова О. В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в столбиках с рыльцами кукурузы. *Фармация*. 2008; 7: 14–17.
4. Зверев Я. Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Антиоксидантная и противовоспалительная активность. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017; 15(4): 5–13. DOI: 10.17816/RCF1545-13
5. Куркина А. В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара: ООО «Офорт». 2012; 290 с.
6. Сорокина А. А., Марахова А. И., Станишевский Я. М., Ковалева Т. Ю. Фотометрические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе: монография. М.: РУДН. 2015: 155.
7. Федосеева Л. М., Кутателадзе Г. Р. Изучение некоторых фенольных соединений надземной части щавеля кислого, произрастающего на территории Алтайского края. *Химия растительного сырья*. 2017; 4: 91–96. DOI: 10.14258/jcprm.2017041861
8. Эрмер И., Миллер Д. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучшей практики. М.: Группа компаний «Виалек», 2013: 512.
9. Bicker J., Petereit F., Hensel A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*. 2009; 80 (8): 483–495. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.08.015.
10. Castle T. *Lexicon Pharmaceuticum or a pharmaceutical dictionary, comprehending the pharmacopoeias of London, Edinburgh, and Dublin, with a variety of other useful information relative to medicine and pharmacy*. Charleston: *Nabu Press*. 2011: 4.
11. Duke J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: *CRC Press*, 2002: 683–684.
12. Kato T., Morita Y. C-glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* 1990; 38(8): 2277–2280. DOI: 10.1248/cpb.38.2277.
13. Oliff H. S. Scientific and clinical monograph for Sinupret. American botanical council: 14. Available at: abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret_fullmono.pdf
14. Thompson A. T. A conspectus of the Pharmacopoeias of the London, Edinburgh, and Dublin Colleges of Physicians being a practical compendium of Materia medica and pharmacy. London: *Forgotten Books*. 2017: 2–3.
15. Vasas A., Orban-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175: 198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.
5. Kurkina A. V. Flavonoids of pharmacopoeial plants. Samara: LLC «Ofort». 2012: 290. (In Russ.).
6. Sorokina A. A., Marakhova A. I., Stanishevskii Ya. M., Kovaleva T. Yu. Photometric methods in the analysis of medicinal plant materials and preparations based on it: monograph. M.: *RUDN*. 2015: 155. (In Russ.).
7. Fedoseeva L. M., Kutateladze G. R. Study of some phenolic compounds of the common sorrel aeral part, growing in the Altai Territory. *Chemistry of plant raw material*. 2017; 4: 91–96. DOI: 10.14258/jcprm.2017041861 (In Russ.).
8. Ermer Y., Miller D. Method validation in pharmaceutical analysis. Examples of best practices. M.: *Group of Companies «Vialek»*. 2013: 512. (In Russ.).
9. Bicker J., Petereit F., Hensel A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*. 2009; 80(8): 483–495. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.08.015.
10. Castle T. *Lexicon Pharmaceuticum or a pharmaceutical dictionary, comprehending the pharmacopoeias of London, Edinburgh, and Dublin, with a variety of other useful information relative to medicine and pharmacy*. Charleston: *Nabu Press*. 2011: 4.
11. Duke J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton: *CRC Press*, 2002: 683–684.
12. Kato T., Morita Y. C-glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L. *Chem. Pharm. Bull.* 1990; 38(8): 2277–2280. DOI: 10.1248/cpb.38.2277.
13. Oliff H. S. Scientific and clinical monograph for Sinupret. American botanical council: 14. Available at: abc.herbalgram.org/site/DocServer/Sinupret_fullmono.pdf
14. Thompson A. T. A conspectus of the Pharmacopoeias of the London, Edinburgh, and Dublin Colleges of Physicians being a practical compendium of Materia medica and pharmacy. London: *Forgotten Books*. 2017: 2–3.
15. Vasas A., Orban-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015; 175: 198–228. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.001.

REFERENCES

1. Azarova O. V., Galaktionova L. P. Flavonoids: mechanism of anti-inflammatory activity. *Chemistry of plant raw material*. 2012; 4: 61–78 (In Russ.).
2. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. M., 2015; 1: 1470. (In Russ.) Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (In Russ.).
3. Evdokimova O. V. Validation of the method of quantitative determination of the amount of flavonoids in columns with stigmas of corn. *Pharmacy*. 2008; 7: 14–17 (In Russ.).
4. Zverev Ya. F. Flavonoids through the eyes of pharmacologist. Antioxidant and anti-inflammatory activity. *Review on clinical pharmacology and drug therapy*. 2017; 15(4): 5–13 DOI: 10.17816/RCF1545-13 (In Russ.).

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-87-91
УДК 615.32: 547.9: 543.544

Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ

Б. В. Бровченко^{1*}, В. А. Ермакова², Д. О. Боков^{2,3}, И. А. Самылина², Н. Б. Лазарева²

1 – ООО «АЗТ Фарма К.Б.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А

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

3 – ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14

*Контактное лицо: Бровченко Богдан. E-mail: b.brovchenko@bk.ru

Статья получена: 12.03.2019. Статья принята к печати: 01.04.2019

Резюме

Введение. Актуальной формой фасовки корней солодки для получения водных извлечений являются фильтр-пакеты. Новые формы переработки корней солодки обеспечивают надлежащие технологические свойства сырья для фильтр-пакетов.

Цель. Проведение сравнительной оценки содержания глицирризиновой кислоты (ГК) в корнях солодки (КС), производимых в РФ и в сырье солодки различных способов переработки методом ВЭЖХ-УФ.

Материалы и методы. Объектами исследований послужили измельченные КС, фасованные в пакеты, промышленного производства и лабораторно-промышленные образцы крупном порошке (КП), гранулах резано-прессованных (ГРП) и композиции, предлагаемой для фасовки в фильтр-пакеты. Определение содержания ГК проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1200, оснащенной фотодиодным детектором (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза – колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250×4,6 мм. Состав подвижной фазы – 5% водный раствор ортофосфорной кислоты: ацетонитрил – (60:40). Скорость потока 1,0 мл/мин, изократический режим элюирования. Температура колонки 30 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длине волны 254 нм; время хроматографирования – 15 мин.

Результаты их обсуждения. Определено содержание ГК в КП, ГРП и композиции порошка и резано-прессованных гранул – в соотношении 80:20 (композиция). Установлено, что содержание ГК варьирует в КС в диапазоне – 7,08–9,17%, КП – 3,87–3,90%, ГРП – 6,88–7,08% и композиции – 4,44–4,88%.

Заключение. Применение ВЭЖХ-УФ метода для стандартизации корней солодки отечественного производства и корней различных форм переработки является весьма перспективным. Методика может рекомендоваться к включению в Государственную Фармакопею Российской Федерации последующего издания, что позволит гармонизировать требования к качеству отечественного сырья солодки с требованиями зарубежных фармакопей.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, корни солодки, моноаммония глицирризинат, ВЭЖХ-УФ, количественное определение, крупный порошок, гранулы резано-прессованные, композиция.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Бровченко Б. В., Ермакова В. А., Боков Д. О., Самылина И. А., Лазарева Н. Б. Оценка содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки и продуктах их переработки методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 87–91.

Evaluation of Glycyrrhizic Acid Content in Licorice Roots and Products of its Processing by HPLC-UV Method

Б. В. Бровченко^{1*}, В. А. Ермакова², Д. О. Боков^{2,3}, И. А. Самылина², Н. Б. Лазарева²

1 – LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

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

3 – Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustyinsky pr., Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Bogdan V. Brovchenko. E-mail: b.brovchenko@bk.ru

Received: 12.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Abstract

Introduction. The actual form of packaging licorice roots for water extraction are filter paper sachets. New forms of licorice root processing provide the proper technological properties of raw materials for filter paper sachets.

Aim. A comparative assessment of the of glycyrrhizic acid (GA) content in licorice roots (LR), produced in the Russian Federation and in licorice raw materials of various processing methods by HPLC-UV.

Materials and methods. The objects of research were crushed LR, packaged in packs of industrial production and laboratory-industrial samples of coarse powder (CP), cut-pressed granules (CPG) and compositions proposed for packaging in filter paper sachets. The determination of GA content was carried out on an Agilent 1200 high performance liquid chromatography system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies, USA). The stationary phase is column Phenomenex Luna® C18(2) 250×4.6 mm. The composition of the mobile phase – 5% orthophosphoric acid water solution: acetonitrile (60:40). A flow rate – 1.0 ml/min, isocratic elution mode. The temperature of the column – 30 °C. The sample injected volume – 10 µl. Detection was performed at a wavelength of 254 nm; run time – 15 minutes.

Results and discussion. The GA content in CP, CPG and the composition of CP and CPG – was determined in the ratio of 80:20 (composition). It was established that the GA content varies in the LR in the range – 7.08–9.17%, CP – 3.87–3.90%, CPG – 6.88–7.08%, and the composition – 4.44–4.88%.

Conclusion. The use of HPLC-UV method for the standardization of licorice roots of domestic production and the roots of various forms of processing is very promising. The technique can be recommended for inclusion in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation of a subsequent edition, which will allow harmonizing the quality requirements of domestic licorice raw materials with the requirements of foreign pharmacopoeias.

Keywords: glycyrrhizic acid, licorice roots, monoammonium glycyrrhizinate, HPLC-UV, quantitative determination, coarse powder, cut-pressed granules, composition.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Brovchenko B. V., Ermakova V. A., Bokov D. O., Samylina I. A., Lazareva N. B. Evaluation of glycyrrhizic acid content in licorice roots and products of its processing by HPLC-UV method. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 87–91.

ВВЕДЕНИЕ

Корни солодки в настоящее время являются наиболее используемым в медицине видом лекарственного растительного сырья. Широкий спектр фармакологической активности обусловлен химическим составом данного вида сырья, а именно наличием различных групп биологически активных соединений (БАС), наибольший интерес из которых представляют тритерпеновые сапонины: глицирризиновая кислота и ее производные [1–4]. Корни солодки используются в качестве сырья для приготовления отваров, в производстве различных сборов и многочисленных лекарственных средств.

Популярной формой фасовки лекарственных растительных субстанций для получения водных извлечений являются фильтр-пакеты [5]. Производство корней солодки, фасованных в фильтр-пакеты по традиционной технологии, до настоящего времени не осуществлялось, так как для этого вида сырья характерна выраженная волокнистая структура, ухудшающая сыпучесть порошка и снижающая его насыпную плотность. Для решения этой задачи на ОАО «Красногорсклексредства» была разработана новая форма переработки сырья солодки: в виде крупного порошка (КП) с размером частиц 2–0,2 мм; гранул резано-пресованных (ГРП) и композиции порошка и резано-пресованного сырья – КП:ГРП в соотношении 80:20 (композиция). Согласно ОФС.1.4.1.0022.15 гранулы резано-пресованные – лекарственная форма, представляющая собой кусочки цилиндрической, округлой или неправильной формы, полученные из лекарственного растительного сырья и предназначенные для получения водных извлечений [6]. Композиция по своим технологическим свойствам (размер частиц, насыпная плотность, сыпучесть и др.) отвечает требованиям необходимым для фасовки корней солодки в фильтр-пакеты [7]. Сравнительный анализ качественного химического состава КП, ГРП и Композиции методом ТСХ подтвердил их идентичность [8].

Цель исследования

Целью данного исследования явилось определение количественного содержания ГК в КС, КП, ГРП и композиции методом ВЭЖХ-УФ.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований послужили измельченные корни солодки (КС), фасованные в пакеты, производства ОАО «Красногорсклексредства» (серии под обозначением «КРПС»), ЗАО «Здоровье» (серия под обозначением «ЗД»), ООО «Лекра-СЭТ» (серия под обозначением «ЛС»); лабораторно-промышленные образцы КП, ГРП и композиции, предлагаемой для фасовки в фильтр-пакеты по 1,5–2,0 г (под соответствующими обозначениями – «КП», «ГРП», «К»).

Определение содержания ГК проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Методика была разработана с учетом основных физико-химических свойств ГК и матрицы – лекарственного растительного сырья. Подбор оборудования, подвижной и неподвижной фаз осуществлялся в соответствии с критериями приемлемости и доступности для контрольно-аналитических лабораторий в РФ. Валидация методики проводилась в соответствии с [10, 11].

Для анализа использовалась система высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1200, оснащенной фотодиодноматричным детектором (Agilent Technologies, США). Неподвижная фаза – C18 как наиболее подходящая для анализа ГК, исходя из её физико-химических свойств; колонка Phenomenex Luna® C18(2) 250x4,6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм с предколонкой C18, 4x3,0 мм. Состав подвижной фазы – 5% водный раствор ортофосфорной кислоты: ацетонитрил – (60:40). Скорость потока 1,0 мл/мин, изократический режим элюирования. Температура колонки 30 °С. Объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Время хроматографирования – 15 мин.

В качестве стандартного образца использовалась соль глицирризиновой кислоты – глицирризинат аммония кислоты (Ammonium Glycyrrhizate USP, Catalog # 1029929, Lot F0L228, США).

Реактивы для экспериментального исследования применяли с маркировкой чистоты «ХЧ», «ЧДА», «ОСЧ».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика приготовления раствора для анализа. Около 0,5 г (точная навеска) измельченной пробы, размером частиц проходящих сквозь сито 0,2 мм помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мл растворителя (метанол : вода для хроматографии в соотношении 30:70), закрывают пробкой, перемешивают и обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут при 35 кГц. По истечении установленного времени, колбу вынимают из УЗ-ванны, дают раствору остыть в течение 10 мин, затем снова обрабатывают ультразвуком в течение 30 минут. При охлаждении раствора, в перерывах между экстрагированиями, воду в бане заменяют на свежую, с комнатной температурой. Дают раствору отстояться 10 мин. С помощью механического дозатора отбирают 5 мл раствора из центра колбы и фильтруют через фильтр типа «Миллипор» из поливинилиденфторида (0,45 мкм, PVDF, «Millipore», США) или аналогичный, отбрасывая первый мл фильтрата [12].

В качестве стандартного раствора использовали 0,66 мг/мл раствор ГК в метаноле и воде для хроматографии (30:70).

Содержание глицирризиновой кислоты в 1 г сырья в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_x \times a_0 \times 100 \times P}{S_0 \times a_x \times 25},$$

где S_x – площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – средняя площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора; a_x – навеска препарата, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Все определения проводили в трехкратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 ГФ XIV [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения содержания ГК в КС, КП, ГРП и композиции представлены в таблицах 1–4. Типичные хроматограммы представлены на рисунке 1.

Таблица 1. Содержание глицирризиновой кислоты в корнях солодки

Table 1. The content of glycyrrhizic acid in licorice roots

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КРЛС 131116	7,08	7,08	0,006	0,08
	7,07			
	7,08			
КРЛС 141216	7,82	7,80	0,025	0,32
	7,77			
	7,8			
КРЛС 111017	9,15	9,17	0,021	0,23
	9,19			
	9,16			
КРЛС 141217	8,16	8,16	0,006	0,07
	8,17			
	8,16			
КРЛС 101118	7,79	7,75	0,035	0,45
	7,72			
	7,75			
КРЛС 20218	7,65	7,63	0,020	0,26
	7,61			
	7,63			
ЗД 031117	7,48	7,48	0,006	0,08
	7,48			
	7,49			
ЛС 01122016	7,58	7,58	0,006	0,08
	7,58			
	7,59			

Таблица 2. Содержание глицирризиновой кислоты в крупном порошке

Table 2. The content of glycyrrhizic acid in coarse powder

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КП 040217	3,80	3,79	0,015	0,40
	3,77			
	3,79			
КП 050217	3,91	3,90	0,012	0,30
	3,89			
	3,89			
КП 070217	3,86	3,87	0,010	0,26
	3,88			
	3,87			

Таблица 3. Содержание глицирризиновой кислоты в гранулах резано-пресованных

Table 3. The content of glycyrrhizic acid in cut-pressed granules

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
ГРП 011216	6,85	6,88	0,030	0,44
	6,91			
	6,88			
ГРП 021216	7,02	7,01	0,006	0,08
	7,01			
	7,01			
ГРП 031216	7,09	7,08	0,010	0,14
	7,07			
	7,08			

Таблица 4. Содержание глицирризиновой кислоты в композиции

Table 4. The content of glycyrrhizic acid in the composition

Серия	Содержание, %	Среднее значение, %	С ст. откл.	RSD%
КП 040217/ ГРП 011216	4,87	4,88	0,006	0,12
	4,88			
	4,88			
КП 050217/ ГРП 021216	4,45	4,44	0,006	0,13
	4,44			
	4,44			
КП 070217/ ГРП 031216	4,49	4,50	0,006	0,13
	4,50			
	4,50			

Результаты определения содержания ГК свидетельствуют о том, что наибольшее ее количество обнаружено в образцах ГРП (7,08%) и в КС (9,17%). Достаточно высокое содержание ГК установлено в Композиции (4,88%), а наиболее низкое – в КП (3,79%).

Эти результаты вполне согласуются с технологическими особенностями производства КП и ГРП, а

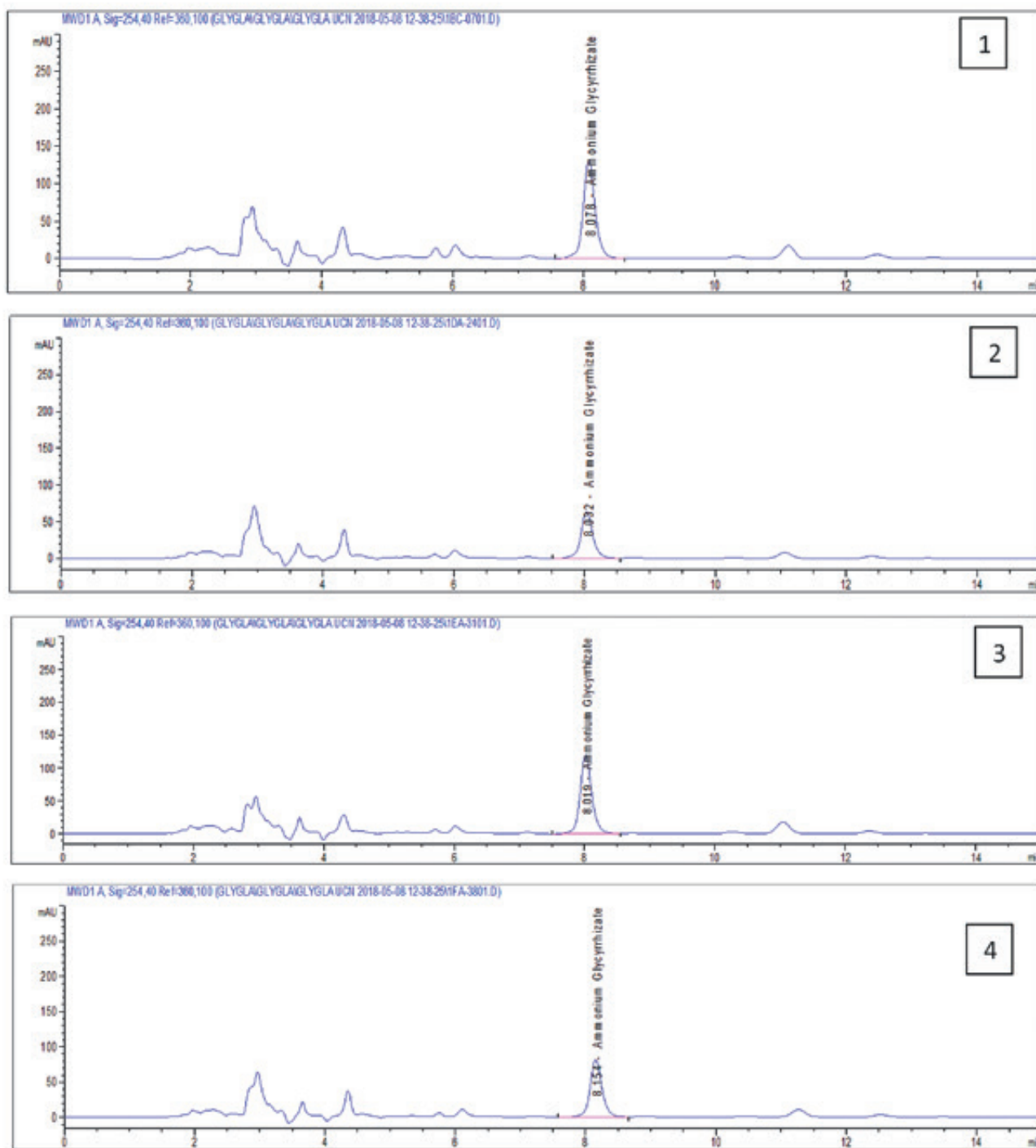


Рисунок 1. Типичные ВЭЖХ-УФ хроматограммы: 1 – КРЛС 131116; 2 – КП 040217; 3 – ГРП 011216; 4 – композиция (КП 040217 / ГРП 011216)

Figure 1. Typical HPLC-UV chromatograms: 1 – KRLS 131116; 2 – CP 040217; 3 – CPG 011216; 4 – composition (CP 040217 / CPG 011216)

именно в производстве ГРП используется фракция из-мельченного сырья с размером частиц 0,31–0,18 мм, в которую попадают наиболее хрупкие части корней, как правило, более богатые БАС, в том числе и ГК. Композиция – КП : ГРП в соотношении 80:20 отвечает всем технологическим характеристикам, необходимым для производства фильтр-пакетов и содержит достаточное количество ГК [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнительное определение содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки различных форм переработки. Установлено, что содержание ГК варьирует в КС в диапазоне – 7,08–9,17%, КП – 3,87–3,90%, ГРП – 6,88–7,08% и композиции – 4,44–4,88%. Представлена возможность использования

композиции (КП 80: ГРП 20) для производства корней солодки, фасованных в фильтр-пакеты.

Метод ВЭЖХ-УФ позволяет проводить идентификацию и количественное определение только ГК (без сопутствующих соединений), в то время как суммарный показатель, регламентирующий качество сырья в ГФ IV (содержание ГК – не менее 6%), получаемый при помощи метода спектрофотометрии, несколько завышен и с недостаточной точностью отражает истинное содержание ГК в сырье. Таким образом, указанный ВЭЖХ-УФ метод является перспективным для стандартизации корней солодки и различных форм их переработки и может рекомендоваться к включению в Государственную Фармакопею Российской Федерации последующего издания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang C. L., Zhang R. Y., Han Y. S. et al. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1991; 26(2): 147–151.
2. Sabbioni C., Mandrioli R., Ferranti A., Bugamelli F., Saracino M. A., Forti G. C., Raggi M. A. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1081(1): 65–71.
3. Baltina L. A. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10(2): 155–171.
4. Kinoshita T., Tamura Y., Mizutani K. The isolation and structure elucidation of minor isoflavonoids from licorice of *Glycyrrhiza glabra* origin. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: 847–849.
5. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (accessed 25.02.2019).
6. ОФС.1.4.1.0022.15 Гранулы резано-прессованные. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 2. Москва. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
7. Ермакова В. А., Бровченко Б. В. Изучение технологических показателей порошка корней солодки и резано-прессованного сырья. *V научно-практическая конференция Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине*. 2017: 43.
8. Ермакова В. А., Бровченко Б. В., Бобкова Н. В. Изучение характеристик подлинности различных видов переработки сырья солодки. *Сборник I Съезд натуротерапевтов России*. Москва. 2009: 125.
9. ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1. Москва. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
10. Валидация аналитических методик ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 Государственная Фармакопея РФ XIII. Том 1. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
11. Береговых В. В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: *Литерра*. 2008: 132.
12. Тутельян В. А., Эллер К. И. и др. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи. М.: *Династия*. 2010: 180.

ACKNOWLEDGMENT

The publication has been prepared with the support of the «Sechenov First Moscow State Medical University Program 5-100».

REFERENCES

1. Wang C. L., Zhang R. Y., Han Y. S. et al. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Yao Hsueh Hsueh Pao*. 1991; 26(2): 147–151.
2. Sabbioni C., Mandrioli R., Ferranti A., Bugamelli F., Saracino M. A., Forti G. C., Raggi M. A. Separation and analysis of glycyrrhizin, 18 β -glycyrrhetic acid and 18 α -glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1081(1): 65–71.
3. Baltina L. A. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10(2): 155–171.
4. Kinoshita T., Tamura Y., Mizutani K. The isolation and structure elucidation of minor isoflavonoids from licorice of *Glycyrrhiza glabra* origin. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: 847–849.
5. The state register of medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (accessed 25.02.2019) (in Russ.).
6. GPM.1.4.1.0022.15 Cut-pressed granules. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 2. Moscow. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019) (in Russ.).
7. Ermakova V. A., Brovchenko B. V. The study of technological indicators of powder licorice roots and shredded pressed raw materials. *V scientific-practical conference Modern aspects of the use of plant materials and raw materials of natural origin in medicine*. 2017: 43. (in Russ.).
8. Ermakova V. A., Brovchenko B. V., Bobkova N. V. Study of the characteristics of authenticity of various types of processing licorice raw materials. Collection I Congress of naturotherapists of Russia. Moscow. 2009: 125. (in Russ.).
9. GPM.1.1.0013.15 «Statistical processing of chemical experiment results» State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. Volume 1. Moscow. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019) (in Russ.).
10. Validation of analytical techniques SP XIV, PM.1.1.0012.15 State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII. Volume 1. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (accessed 24.02.2019).
11. Beregovykh V. V. Validation of analytical methods for drug manufacturers. M.: *Literra*. 2008: 132. (in Russ.).
12. Tutelyan V. A., Eller K. I. et al. Methods of analysis of minor biologically active substances of food. M.: *Dynasty*. 2010: 180. (in Russ.).

IV ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ

с международным участием

23-25 СЕНТЯБРЯ 2019

СВЕТЛОГОРСК, КАЛИНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ

1000+
участников

110+
спикеров

300+
руководителей

470+
организаций

Языки: русский, английский
www.gosgmp.ru



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-93-97
УДК 615.4; 543.641; 543.054

Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофициальных растениях

М. П. Макарова^{1*}, А. В. Сыроешкин¹, Т. В. Максимова¹, И. С. Матвеева², Т. В. Плетенёва¹

¹ – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО РУДН), Медицинский институт, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² – ФГБУ «Государственный океанографический институт имени Н.Н. Зубова» (ФГБУ «ГОИН»), Росгидромет, 119034, Россия, г. Москва, Кропоткинский пер., д. 6

*Контактное лицо: Макарова Мария Павловна. E-mail: tabulett6@gmail.com

Статья получена: 25.03.2019. Статья принята к печати: 15.04.2019

Резюме

Введение. Химический состав растений зависит от элементного состава среды обитания, а также отражает видовые и индивидуальные особенности растения. Перед использованием любого растения в лечебных целях, необходимо также собрать как можно более полную информацию об элементном составе исходного сырья.

Цель. Следовательно, возникла возможность создания методики экспресс-определения микроэлементов в растениях методом рентгено-флуоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы. В соответствии с положением международной интеркалибрации в системе МАГАТЭ (IAEA-433) для обеспечения внешнего контроля качества (QA/QC) лабораторного элементного анализа использовали международный стандартный образец NIST SRM 2976, аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий (США). Для цинка проведено сличение результатов анализа растительного сырья методами РФА (экспресс-анализ) и ААС с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией фона после микроволновой кислотной минерализации биоматериала. Для обеспечения воспроизводимости результатов РФА критически необходимо мягкое высушивание и диспергирование растительного сырья.

Результаты их обсуждения. Представлены результаты рентгено-флуоресцентного анализа (РФА) элементного состава плодов (*fructus Anethi graveolentis* L.), семян (*semina Cucurbitae pepo* L., *semina Menthae arvensis* L., *semina Cucumis sativa* L., *semina Kalanchoës daigremontianae*) и листьев (*folia Callisiae fragrantis* L.) лекарственных и неофициальных растений. Разработанные методики РФА и ААС анализа применены для контроля технологии обогащения листьев каллизии душистой соединениями цинка при различном изотопном составе водных растворов.

Заключение. Показана возможность создания металл-модифицированных растений с содержанием цинка 1,4 мг/г сухой массы.

Ключевые слова: рентгено-флуоресцентный анализ; эссенциальные микроэлементы; цинк; референс-образец; обеднённая по дейтерию вода; лекарственные растения.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Источник финансирования: публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

Для цитирования: Макарова М. П., Сыроешкин А. В., Максимова Т. В., Матвеева И. С., Плетенёва Т. В. Особенности экспресс-определения микроэлементов в лекарственных и неофициальных растениях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 93–97.

Features of Microelements Express-determination in Medicinal and Nonofficial Plants by X-Ray-Fluorescence Analysis

М. П. Makarova^{1*}, А. В. Syroeshkin¹, Т. В. Maksimova¹, И. С. Matveeva², Т. В. Pleteneva¹

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

² – N.N. Zubov State Oceanographic Institute (SOI), Roshydromet, 6, Kropotkinsky Lane, Moscow, 119034, Russia

*Corresponding author: Maria P. Makarova. E-mail: tabulett6@gmail.com

Received: 25.03.2019. Accepted: 15.04.2019

Abstract

Introduction. The chemical composition of plants depends on the elemental composition of the habitat, and also reflects the species and individual characteristics of the plant. Before using any plant for medicinal purposes, it is also necessary to collect as much information as possible about the elemental composition of the feedstock.

Aim. Consequently, it became possible to create a method for the rapid determination of trace elements in plants using the X-Ray fluorescent method.

Materials and methods. In accordance with the international intercalibration standard in the IAEA system (IAEA-433), an international standard sample NIST SRM 2976, certified by the National Institute of Standards and Technology (USA), was used to provide external quality control (QA/QC) of laboratory elemental analysis. For Zn the results of plant raw powder materials analysis by XRF (express analysis) were compared with AAS by electrothermal atomization and Zeeman background correction after microwave acid mineralization of biomaterials. To ensure the reproducibility of the results of XRF-express analysis, it is absolutely necessary to carry out mild drying and dispersion of the plant material.

Results and discussion. The results of X-ray fluorescence (XRF) analysis of the elemental composition of the fruits (*fructus Anethi graveolens* L.), the seeds (*semina Cucurbitae pepo* L., *semina Menthae arvensis* L., *semina Cucumis sativa* L., *semina Kalanchoës daigremontianae*) and leaves (*folia Callisiae fragrantis* L.) of medicinal and nonofficial plants are presented in the article. The methods of XRF and AAS analysis have been developed for the technology of essential microelements enrichment in of *Callisiae fragrantis* control leaves at different ratios of hydrogen isotopologues (D/H) in the water.

Conclusion. For example, zinc(II) has demonstrated the ability to create modified plants with high content of essential microelement, up to 1.4 mg /g dry weight.

Keywords: X-ray fluorescence analysis, essential microelements, zinc, reference sample, deuterium-depleted water, medicinal plants.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Source of funding: publication prepared with the support of the PFUR «5-100» Program.

For citation: Makarova M. P., Syroeshkin A. V., Maksimova T. V., Matveeva I. S., Pleteneva T. V. Features of microelements express-determination in medicinal and nonofficial plants by X-ray-fluorescence analysis. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 93–97.

ВВЕДЕНИЕ

Биогеохимический профиль растительной биомассы является, как известно, видовым признаком [1]. Элементный профиль зависит от условий произрастания, условий культивирования растений. Существование взаимно-однозначных соответствий «вид – элементный профиль» позволяет использовать контроль элементного состава лекарственных и нефармакопейных растений для определения подлинности растительного сырья. Кроме того, контроль элементного состава растений позволяет оценить экологическую безопасность ареала произрастания дикорастущего растения и контролировать технологию выращивания культивируемых видов.

Координационные соединения с ионами микроэлементов в качестве центрального атома, содержащиеся в растениях, могут играть роль терапевтических и профилактических средств. Аккумуляция ряда эссенциальных микроэлементов в растении может рассматриваться как проявление его видоспецифичности, но их распределение в растении происходит неравномерно. В связи с этим, а также с учетом сложной структуры растительной матрицы в каждом конкретном случае требуется индивидуальный подход к выбору пробы для анализа, ее предварительной подготовки и обязательного использования идентичного референс-образца с заданным количеством микроэлементов [2]. Точность (правильность и прецизионность) анализа методом рентгено-флуоресцентной спектроскопии зависит в первую очередь от специфики пробоподготовки и использования референс-образца. Рентгено-флуоресцентный анализ (РФА) успешно применяется для определения элементного профиля сплавов металлов и порошков неорганических соединений. Использование метода в элементном анализе органических объектов, в том числе растительных материалов, требует специальной предварительной пробоподготовки. Она включает низкотемпературную («мягкую») сушку и гомогенизацию пробы. РФА может найти применение при внедрении в фармацевтическую практику нового технологического процесса – обогащения растения необходимыми микроэлементами в специальных условиях. В статье рассматриваются возможности и условия использования РФА в контроле насыщения растения цинком из водных растворов глицината цинка при соотношения изотопологов водорода $[D]/[H]$ ниже природного (<140 ppm).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для построения калибровочных прямых использовали цинка сульфат гептагидрат ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) $>99,5\%$, Ph. Eur. grade (Sigma-Aldrich, США). Материалы матриц, прозрачные для рентгеновских лучей: лактоза моногидрат (ХИММЕД, Россия; Lot № 8507102612); борная кислота х.ч. (ООО «Реактив», Россия), бычий сывороточный альбумин (BCA) $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, США,

каталожный номер A6003), глицин ACS reagent, $\geq 98,5\%$ (Sigma-Aldrich, США, каталожный номер 410225).

Различные навески соли $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ смешивали с материалом «подложки» – лактозы, борной кислоты, бычьего сывороточного альбумина (около 1,0 г), смесь гомогенизировали в механической мельнице. Используя ситовой анализ, отбирали фракцию с размером частиц от 37 до 63 мкм ($D_{ср.} = 47 \pm 6$ мкм) по данным лазерного малоуглового измерителя дисперсности [3].

Лекарственное и неофициальное растительное сырьё: укропа пахучего плоды (*Anethi graveolentis fructus*), цельные (ООО «ГАВРИШ», Россия); тыквы семена (*Cucurbitae pepo semina*), цельные и очищенные (ООО «ГАВРИШ», Россия); огурца посевного семена (*Cucumis sativa semina*), цельные; мяты полевой семена (*Menthae arvensis semina*), цельные («Sanrival» и «Sèmelavie», Франция); каланхоэ Дагребмона семена (*Kalanchoës daigremontianae semina*), свежие и высушенные; каллизии душистой листья (*Callisiae fragrantis folia*), свежие и высушенные.

Выбор каллизии душистой в качестве модельного объекта, аккумулирующего микроэлементы, не случаен, так как это растение детально охарактеризовано с позиций фитохимии и фармакогнозии. Доказаны её антигипоксическая активность, стресспротективные и иммуномодулирующие свойства, а также возможность применения при некоторых дерматозах. Растение удобно в эксперименте, поскольку не требует особых условий выращивания.

Растворы глицината цинка [бис(глицинато-N,O)цинк] (20 mM глицин и 1 mM $ZnSO_4$, pH=6,8) готовили на водах с различным содержанием дейтерия: деионизированная высокоомная вода (18 МОм \times см при 25 °C) природного изотопного состава ($D/H=140$ ppm) – BD, полученная путем очистки апиригенной дистиллированной воды в системе Milli-Q (Millipore, Великобритания); вода с пониженным содержанием дейтерия (deuterium depleted water – DDW, $D/H=12$ ppm, «лёгкая» вода) получена низкотемпературной вакуумной ректификацией.

В исследовании использовали международный стандартный образец NIST SRM 2976, изготовленный в MEL IAEA (МАГАТЭ) и аттестованный Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, USA).

Все результаты представлены для 3–5 повторов с доверительной вероятностью 95%. Каждое измерение было выполнено в полном цикле воспроизведения всего эксперимента с 15–25 кратным повторением измерений внутри одного цикла. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программы OriginPro®9, OriginLab Corporation, USA.

Приборы и оборудование. Содержание микроэлементов в растительных материалах определяли методом РФА, используя энергодисперсионный рентгено-флуоресцентный спектрофотометр на базе кремниевого дрейфового детектора с термоэлектрическим охлаждением – EDX-7000 (Shimadzu, Япония). Для изме-

рения интенсивности излучения были выбраны одинаковые настройки прибора для всех видов исследуемых образцов: закрытая кювета, майларовая плёнка, коллиматор 10 мм, время экспозиции 1000 с, $I=100 \mu\text{A}$. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа тех же материалов аккредитованным методом – атомно-абсорбционной спектрометрией (ААС): спектрометр «SpectrAA-800» (Agilent Technologies, США) с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией фона после предшествующей кислотной минерализации растительного материала под действием микроволнового облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение содержания микроэлементов в референс-образце методом РФА. При анализе материалов органической природы возникают дополнительные сложности, обусловленные выбором материала матрицы («подложки»). В связи с этим для построения калибровочных прямых нами были исследованы различные по природе материалы матрицы: лактоза, борная кислота и БСА). Как и ожидалось, калибровочные графики критически зависят от природы матрицы, а в случае БСА зависимость сигнала флуоресценции от массовой доли сульфата цинка имеет сигмоидный вид. Это указывало на необходимость применения протокола QA/QC и использования международного референс-образца со сложной органической матрицей. Для обеспечения метрологической достоверности результатов анализу растительных материалов предшествовало исследование референс-образца с известным содержанием микроэлементов. Референс-образец представляет собой высокодисперсный порошок биологического материала, гомогенизированный и высушенный методом лиофильной сушки [4].

Элементный профиль международного стандартного образца NIST SRM 2976: был измерен с кюветой с полипропиленовой пленкой, в режиме внешней атмосферы, коллиматор — 10 мм. Для элемента Cl интенсивность флуоресценции составила $6,34 \pm 0,09 \text{ cps}/\mu\text{A}$, а содержание $57000 \pm 5000 \text{ мкг/г}$; для K – $3,31 \pm 0,02$ и 9700 ± 500 , соответственно; для Ca – $10,26 \pm 0,03$ и 7600 ± 300 ; S – $0,66 \pm 0,02$ и $0,109 \pm 0,008$; Br – $3,78 \pm 0,04$ и 329 ± 15 ; Fe – $2,80 \pm 0,03$ и $171,0 \pm 4,9$; Zn – $0,67 \pm 0,01$ и $137,0 \pm 13,0$; Cu – $3,32 \pm 0,28$ и $4,02 \pm 0,33$; Mn – $0,40 \pm 0,01$ и 33 ± 2 ; Se – $0,023 \pm 0,002$ и $1,80 \pm 0,15$; Sr – $4,32 \pm 0,39$ и 93 ± 2 . Полученные результаты соответствовали представленному протоколу для референс-образца.

2. Сравнение результатов анализа методами РФА и ААС при определении цинка в различных растительных материалах. На основании результатов, полученных для референс-образца, было определено содержание цинка в плодах и семенах четырёх растений двумя методами анализа (таблица 1).

Таблица 1. Содержание цинка ($\bar{X} \pm S$) в плодах и семенах различных растений. $n=3$, $P=0,95$.

Table 1. Zinc content ($\bar{X} \pm S$) in the fruits and seeds of various plants. $n=3$, $P=0.95$

Вид растительного сырья	Содержание цинка, мкг/г	
	Метод РФА	Метод ААС
Плоды укропа кустистого (semina <i>Anethi graveolentis</i>)	$68,0 \pm 0,6$	74 ± 15
Семена тыквы обыкновенной очищенные (semina <i>Cucurbitae pepo</i>)	$160,0 \pm 0,8$	101 ± 20
Семена мяты полевой (semina <i>Menthae arvensis</i> L.)	$62,0 \pm 0,1$	67 ± 13
Семена мяты полевой (semina <i>Menthae arvensis</i> L.)	$57,0 \pm 0,6$	63 ± 13

Сличение результатов, полученных двумя методами, свидетельствует о их высокой сходимости. Результат представляет несомненный интерес с точки зрения идентичности элементных профилей семян растений различных видов. Некоторые элементы полностью совпадают по содержанию, другие отличаются, но в пределах одного порядка.

3. Влияние высушивания растительного сырья на результаты элементного анализа методом РФА.

Для исследования влияния высушивания растения на результаты определения микроэлементов в растительном сырье методом РФА были исследованы элементный профиль листьев свежей и высушенной каллизии душистой (рисунки 1).

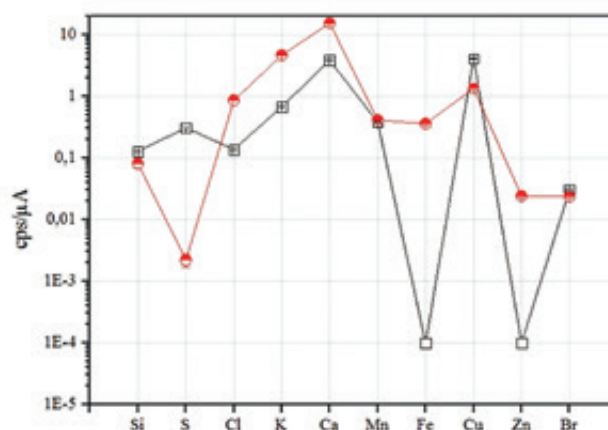


Рисунок 1. Микроэлементные профили свежих и высушенных листьев каллизии душистой (folia *Callisiae fragrantis* L.): свежее сырье – квадрат; высушенное сырье – круг. Ордината – $\log_{10} (\text{cps}/\mu\text{A})$

Figure 1. Trace element profiles of fresh and dried leaves (folia *Callisiae fragrantis* L.): fresh raw material – square; dried raw material – circle. The ordinate is $\log_{10} (\text{cps}/\mu\text{A})$

Полученный результат позволяет разделить элементы на три группы. Первая группа – это сера и медь: для них характерно снижение содержания в пробе после высушивания. Для них возможен переход в газовую фазу летучих соединений неорганической и органической природы. Вторая группа – это кремний, мар-

ганец и бром – характеризуется отсутствием влияния высушивания на результат анализа. К ней следует отнести также хлор, калий и кальций – их содержание изменяется, но незначительно, в пределах одного порядка. Третья группа – это железо и цинк. Обнаруженное увеличение их содержания на несколько порядков при высушивании растения связано с тем, что координационные хелатные соединения с центральными атомами Fe(II) и Zn(II), расположенные в различных органеллах растения, при потере влаги в процессе высушивания сырья концентрируются и становятся проникаемыми для рентгеновских лучей.

4. Влияние диспергирования растительного материала на результаты определения микроэлементов методом РФА. Влияние степени измельченности растительного материала на результаты элементного анализа исследовали для цельных, резаных и гомогенизированных семян каланхоэ (рисунок 2).

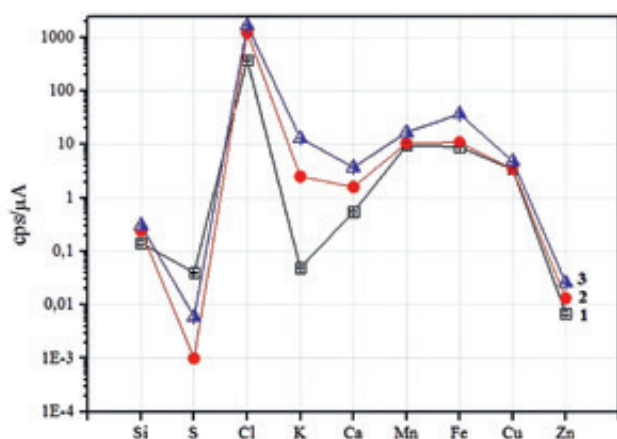


Рисунок 2. Микроэлементные профили семян каланхоэ Дагремона (*semina Kalanchoës daigremontianae*) цельных – 1, резаных – 2 и гомогенизированных – 3. Ордината – $\log_{10}(\text{cps}/\mu\text{A})$

Figure 2. Trace element profiles of *Kalanchoe Dagremontiana* seeds (*semina Kalanchoës daigremontianae*) whole – 1, cut – 2 and homogenized – 3. The ordinate is $\log_{10}(\text{cps}/\mu\text{A})$

Как следует из полученных результатов, гомогенизированная проба в целом дает более высокий сигнал. Особенно ярко эта картина проявляется для калия, кальция и железа. Используя метод РФА для определения этих элементов в растительном сырье, пробу, несомненно, надо гомогенизировать. Нами были поставлены специальные эксперименты по накоплению макро- и микроэлементов в различных частях листовой пластинки. Оно может достигать порядковых различий при движении от корешка к апикальной части. Это явление необходимо учитывать при трактовке результатов РФА и разработки методики пробоподготовки.

5. Влияние соотношения изотопологов водорода D/H в питательных водных растворах цинка глицината на степень накопления цинка в листьях

каллизии душистой. Среди эссенциальных d-элементов цинк является наименее токсичным как для растений, так и для животных. В то же время использование неорганических солей цинка в питательных средах невозможно из-за низких значений pH вследствие гидролиза. Побеги каллизии душистой инкубировали в описанном растворе глицината цинка. Выбор именно этого соединения цинка(II) не случаен, так как ранее была доказана его противотуберкулезная активность [5]. Принимая во внимание известный кинетический изотопный эффект водорода для ряда процессов в живых организмах [6], эксперимент проводили с растворами цинк-глицинатного комплекса в бидистиллированной воде (BD) и в воде, обедненной по дейтерию (DDW). За 12 суток содержание цинка в листьях достигло, мкг/г: 0,01–0,02 (BD без глицината цинка); $0,43 \pm 0,05$ (BD с глицинатом цинка); $1,75 \pm 0,25$ (DDW с глицинатом цинка). Как видно, коэффициент накопления цинка при инкубации корней растения в растворе глицината цинка в DDW возрастает многократно по сравнению с бидистиллированной водой природного изотопного состава (таблица 2).

Таблица 2. Коэффициент накопления цинка в листьях каллизии душистой после 12-суточной инкубации корней в растворах глицината цинка в бидистиллированной воде ([D]/[H] = 142 ppm) и в воде, обедненной по дейтерию ([D]/[H] = 12 ppm)

Table 2. Coefficient of Zinc accumulation in *Callisia fragrantis* L. leaves after 12 days root incubation in zinc glycinate solutions in bidistilled water ([D]/[H] = 142 ppm) and in deuterium depleted water (DDW) ([D]/[H] = 12 ppm)

Элемент	Коэффициент накопления	
	BD	DDW
Zn	40 ± 10	160 ± 10
Mn	$1 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$

Приведенные для сравнения результаты определения марганца, не образующего хелатный комплекс, свидетельствуют о постоянстве его содержания в тестируемом растении, независимо от изотопного состава воды. Таким образом, изменение изотопного состава воды может быть использовано в технологии получения элемент-модифицированных растений. Такого рода технологии позволяют использовать модифицированные лекарственные растения в качестве натуральных добавок при гипопэлементозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проанализированы элементные профили (в режиме интеркалибрации метода атомно-абсорбционной спектроскопии с графитовой атомизацией и зеемановской коррекцией фона при микроволновом озолении и метода рентгено-флуоресцентной спектроскопии (РФС) *in situ*) растительного сырья официальных и потенциальных лекарственных растений. Показано, что при условии использования референс-образцов МАГАТЭ со сложной органической матрицей возможно достоверное экспрес-определение микроэлементов в растительном материале с

помощью РФА. На результат определения критически влияет и диспергирование, и высушивание растительного материала, что объясняется крайней неоднородностью распределения микроэлементов в субмикронном и субмиллиметровом диапазоне размеров. Стандартизация пробоподготовки позволяет достичь 10% погрешности по типу А при определении цинка, марганца и железа. С помощью экспресс-анализа показан пример мониторинга изотоп-зависимой (D/H) технологии создания цинк-обогащенных лекарственных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вернандский В. И. Биосфера и ноосфера. – М.: Наука. 1989: 261.
2. Сыроешкин А. В., Матвеева И. С., Чиквиладзе Г. Н. Результаты многолетних интеркалибраций в системе МАГАТЭ. *Микроэлементы в медицине*. 2010; 11(1): 11–14.
3. Krasovskii P. A., Karpov O. V., Balkhanov D. M., Lesnikov E. V., Darkin D. A., Ulyantsev A. S., Matveeva I. S., Pleteneva T. V., Syroeshkin A. V. Nanoparticales in natural mineral waters. Measurement procedure and results. *Measurement Techniques*. 2010; 53(8): 852–857. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11018-010-9587-6>
4. Calder J. A., Jamieson W. D. The Purpose and Program of the IOC/UNEP/IAEA Group of Experts on Standards and Reference Materials. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1990; 338: 378–379. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00322497>.
5. Балышев А. В., Гребенникова Т. В., Сыроешкин А. В. Обоснование противотуберкулезного действия нового Zn^{2+} -содержащего препарата (микроэлементные профили, клеточный иммунитет, неспецифическая резистентность). *Микроэлементы в медицине*. 2004; 5 (4): 6–8.
6. Goncharuk V. V., Syroeshkin A. V., Zlatkiy I. A., Uspenskaya E. V., Orekhova A. V., Levitskaya O. V., Dobrovolskiy V. I., Pleteneva T. V. Quasichemical description of the cell death kinetics of cellular biosensor *Spirostomum Ambigua* for testing the biological activity of aqueous solutions. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2017; 39 (2): 97–102.

REFERENCES

1. Vernandskiy V. I. The Biosphere and noosphere. – Moscow: Science. 1989. (In Russ.).
2. Syroeshkin A. V., Matveeva I. S., Chikviladze G. N. Results of long-term intercomparison exercises in IAEA system. *Trace Elements in Medicine*. 2010; 11(1): 11–14 (in Russ.).
3. Krasovskii P. A., Karpov O. V., Balkhanov D. M., Lesnikov E. V., Darkin D. A., Ulyantsev A. S., Matveeva I. S., Pleteneva T. V., Syroeshkin A. V. Nanoparticales in natural mineral waters. *Measurement procedure and results. Measurement Techniques*. 2010; 53(8): 852–857. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11018-010-9587-6>
4. Calder J. A., Jamieson W. D. The Purpose and Program of the IOC/UNEP/IAEA Group of Experts on Standards and Reference Materials. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1990; 338: 378–379. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00322497>.
5. Balyshv A. V., Grebennikova T. V., Syroeshkin A. V. The substantiation of antituberculous effect of the new Zn^{2+} -contained pharmaceutical (microelement profiles, cell immunity, nonspecific resistance). *Trace Elements in Medicine*. 2004; 5(4): 6–8 (in Russ.).
6. Goncharuk V. V., Syroeshkin A. V., Zlatkiy I. A., Uspenskaya E. V., Orekhova A. V., Levitskaya O. V., Dobrovolskiy V. I., Pleteneva T. V. Quasichemical description of the cell death kinetics of cellular biosensor *Spirostomum Ambigua* for testing the biological activity of aqueous solutions. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2017; 39(2): 97–102.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102
УДК 615.074

ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе

А. А. Скибина^{1*}, Д. О. Боков^{1,2}, И. В. Гравель¹, В. А. Ермакова¹, И. А. Самылина¹

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

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

*Контактное лицо: Скибина Анастасия Алексеевна. E-mail: askibina93@gmail.com

Статья получена: 22.04.2019. Статья принята к печати: 14.05.2019

Резюме

Введение. На сегодняшний день отмечается устойчивая тенденция к увеличению спроса на фитопрепараты, что обуславливает необходимость расширения номенклатуры лекарственных средств растительного происхождения. Как показали последние исследования, перспективным направлением является перевод растительных сборов в форму водорастворимых сухих экстрактов. Грудной сбор № 4 – один из наиболее популярных среди многокомпонентных субстанций растительного происхождения на отечественном фармацевтическом рынке. На его основе был получен сухой экстракт. Согласно литературным данным, известно, что фенольные соединения преобладают как в отдельных компонентах, так и в грудном сборе № 4, поэтому сквозная стандартизация сбора и экстракта на его основе по содержанию веществ из этой группы представляется актуальной.

Цель. Настоящее исследование было выполнено с целью изучения состава фенольных соединений сухого экстракта грудного сбора № 4 и поиска маркерных соединений для сквозной стандартизации сбора и лекарственных форм на его основе.

Материалы и методы. Анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и экстракта проводили методом ВЭЖХ-УФ. Детектирование осуществляли при длинах волн 350, 300, 270, 210 нм. Количественную оценку (%) идентифицированных соединений проводили методом внешнего стандарта.

Результаты и обсуждение. В результате анализа в грудном сборе № 4 обнаружено 58 соединений, в экстракте – 34. Идентифицировано 8 веществ фенольной природы: рутин, арбутин, ликуразид, ликвиритин, кверцетин, хлорогеновая, кофейная и галловая кислоты, содержание которых варьировало в диапазоне 0,001–0,910%.

Заключение. Основываясь на результатах исследования, в качестве маркерных соединений предложено использовать арбутин, рутин и хлорогеновую кислоту.

Ключевые слова: грудной сбор, сухой экстракт, фенольные соединения, ВЭЖХ, стандартизация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Источник финансирования. Исследование поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

Для цитирования: Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 98–102.

HPLC-Analysis of Phenolic Complex in Pectoral Species № 4 and its Dry Extract

А. А. Skibina^{1*}, D. O. Bokov^{1,2}, I. V. Gravel¹, V. A. Ermakova¹, I. A. Samylina¹

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

2 – Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustyinsky pr., Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Anastasia A. Skibina. E-mail: askibina93@gmail.com

Received: 22.04.2019. Accepted: 14.05.2019

Abstract

Introduction. There is steady upward trend in demand for herbal formulation necessitates the expansion of their range. Recent studies have shown that one of the promising research direction is the development of herbal collection based water-soluble dry extracts. Pectoral species № 4 is one of the most popular among multi-component herbal preparations on the Russian pharmaceutical market. Experimental samples of a dry extract were obtained on the collection basis. According to literature, phenolic compounds predominate both in individual components and pectoral species № 4. Therefore, the end-to-end standardization of the collection and its dry extract by the content of the substances seems to be relevant.

Aim. The present study was performed to examine the dry extract phenolic compounds composition, as well as, to search for marker compounds for the end-to-end standardization of pectoral species № 4 and dosage forms based on it.

Materials and methods. The composition and content of phenolic complex were studied by HPLC with UV detection in pectoral species № 4 and its dry extract. Detection was performed at wavelengths of 350, 300, 270, 210 nm. The quantitative content (%) of the identified compounds was determined by an external standard method.

Results and discussion. HPLC-analysis revealed 58 compounds in pectoral species № 4 and 34 in the extract. Rutin, arbutin, liqueraside, liquiritin, quercetin, chlorogenic, caffeic and gallic acid have been identified in all study objects; their quantitative content varied within a range of 0,001–0,910%.

Conclusion. Arbutin, rutin and chlorogenic acid have been proposed as marker compounds.

Keywords: pectoral species, dry extract, phenolic compounds, HPLC, standardization.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Source of financing. The study is supported by the «Project to improve the competitiveness of leading Russian universities among the world's leading research and educational centers».

For citation: Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylina I. A. HPLC-analysis of phenolic complex in pectoral species № 4 and its dry extract. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 98–102.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к растительным препаратам увеличивается как со стороны пациентов, так и врачебного сообщества. В последние годы, однако, для российского коммерческого сектора фитопрепаратов характерно относительное уменьшение объема продаж в натуральном выражении, но положительная динамика в денежном. Это связано с современным напряженным ритмом жизни и представлением в медицинском сообществе о доказательной медицине как единственно верном критерии эффективности препаратов. В результате наблюдается сокращение доли недорогих растительных препаратов и постепенное их вытеснение более дорогостоящими современными, часто не имеющими аналогов [1].

Создание доказательной базы эффективности фармацевтических субстанций растительного происхождения (ФСРП) и препаратов на их основе является необходимым и неотъемлемым условием для развития фитотерапии в рамках современной официальной медицины. Особые успехи в этой области принадлежат немецкой компании Bionorica SE, в основе деятельности которой лежит разработанная ими концепция фитониринга [2]. Такие исследования длительны и требуют немалых финансовых вложений. В то же время многолетний опыт успешного применения сырья лекарственных растений в клинической практике эмпирически подтверждает их эффективность и безопасность. Поэтому, одним из возможных вариантов «быстрых мер» по расширению номенклатуры растительных средств является разработка технологически простых и удобных в применении лекарственных форм (ЛФ) фитопрепаратов, успешно применяемых в медицине. В частности, актуальным является получение водорастворимых сухих экстрактов на основе официальных сборов [1, 3, 4].

Грудной сбор № 4 (ГС № 4) – один из наиболее популярных растительных сборов, представленных на отечественном фармацевтическом рынке [1, 5]. Опыт его применения в клинической практике составляет более 20 лет.

Цель исследования – изучение состава фенольных соединений сухого экстракта ГС № 4 и поиск маркерных соединений для сквозной стандартизации сбора и ЛФ на его основе.

В состав ГС № 4 входят 6 компонентов: ромашки цветки, багульника побеги, ноготков цветки, фиалки трава по 20%, солодки корни 15%, мяты листья 5% [6]. Исследование проводили на промышленных образцах ГС № 4 АО «Красногорсклексредства» и опытно-экспериментальных образцах сухого экстракта, полученных в результате трехкратной экстракции водой питьевой с использованием метода распылительной сушки.

ГС № 4 обладает муколитической, противовоспалительной, антиоксидантной активностью и применяется при инфекционных заболеваниях верхних дыхательных путей. Фармакологический эффект сбора и водорастворимого сухого экстракта на его основе до-

казан в ряде доклинических исследований [9]. Его индивидуальные компоненты содержат различные группы биологически активных веществ (БАВ): эфирные масла, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, полисахариды, слизи, витамины и др., что обуславливает фармакологические свойства сбора [7–10]. Как было установлено ранее [10, 11], преобладающей группой БАВ в составе компонентов и ГС № 4 являются соединения фенольной природы (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, фенологликозиды и др.). Установлено, что оптимальное сочетание фенольных веществ различных классов обеспечивает противовоспалительную и антиоксидантную активность лекарственных растительных средств, хотя точный механизм действия на сегодняшний день остается неясным [12–14]. Как правило, стандартизацию комплексных фитопрепаратов проводят по доминантным соединениям, что позволяет в достаточной мере гарантировать их постоянный состав. С другой стороны, действие комплексных препаратов обусловлено системой взаимодействующих реакций синергитического или антогонистического свойства. Поэтому целесообразным представляется стандартизация сбора и экстракта по нескольким группам БАВ, обеспечивающих их основное фармакологическое действие.

В работе В. В. Амосова (2009) описаны результаты ВЭЖХ-анализа некоторых индивидуальных флавоноидов ГС № 4 (производства ОАО «Красногорсклексредства»), а также водорастворимого сухого экстракта на его основе [9]. Содержание в ГС № 4 кверцетина было $0,126 \pm 0,005\%$, изорамнетина – $0,072 \pm 0,001\%$, апигенина – $0,029 \pm 0,001\%$, кемпферола – $0,016 \pm 0,001\%$. В сухом экстракте содержание этих веществ составило: кверцетина – $0,332 \pm 0,009\%$, изорамнетина – $0,201 \pm 0,007\%$, апигенина – $0,051 \pm 0,001\%$, кемпферола – $0,025 \pm 0,001\%$.

На сегодняшний день нормативная документация на ГС № 4 (ВФС 42-2688-96) устарела и не соответствует современным фармакопейным требованиям [10]. Согласно ВФС, раздел «Качественные реакции» ограничен пробирочными реакциями, раздел «Количественное определение» регламентирует содержание эфирного масла не менее 0,1% (по методу 1 или 2) [15]. Учитывая тот факт, что эфирные масла переходят в водное извлечение грудного сбора в небольшом количестве, целесообразно предложить альтернативные методики стандартизации сбора по нескольким группам БАВ, в частности, по содержанию соединений фенольной природы при помощи современных инструментальных методов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили промышленные образцы ГС № 4 (АО «Красногорсклексредства») и опытно-экспериментальные образцы водорастворимого сухого экстракта ГС № 4.

В работе были использованы стандартные образцы индивидуальных веществ: рутин тригидрат (CAS

№ 250249-75-3, $\geq 94\%$), ликвиритин (CAS № 551-15-5, $\geq 98\%$), кверцетин (CAS № 117-39-5, $\geq 95\%$), хлорогеновая кислота (CAS № 327-97-9, $\geq 95\%$), кофейная кислота (CAS № 331-39-5, $\geq 98\%$), галловой кислоты моногидрат (CAS № 5995-86-8, $\geq 98\%$), арбутин (CAS № 497-76-7, $\geq 98\%$), производства Sigma-Aldrich (США) и рабочий стандартный образец ликуразида. Реагенты: метанол (для ВЭЖХ, J. T. Baker, Нидерланды), ацетонитрил (для ВЭЖХ, Panreac Quimica, S. A., Барселона, Испания), муравьиная кислота (ч.д.а., Merck Laboratories, Германия). В анализе использовалась вода деионизированная, которую при помощи системы очистки воды Millipore Milli-Q plus.

Подготовка образцов для анализа. Для приготовления аналитического раствора экстракта в мерную колбу вместимостью 100 мл, отвешивали 1,00 г (точная навеска) экстракта и прибавляли 50 мл горячей воды очищенной, после чего тщательно перемешивали до полного растворения препарата (при необходимости содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане) и доводили исходным растворителем до метки.

Водное извлечение из сбора готовили по следующей методике: 10,00 г сбора (точная навеска) помещали в круглодонную колбу, прибавляли 100 мл воды, присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 минут. После охлаждения до комнатной температуры (45 минут), содержимое колбы фильтровали через четыре слоя марли в колбу вместимостью 100 мл и доводили объем тем же растворителем до метки. Полученное извлечение фильтровали повторно через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Условия хроматографирования. Хроматографическое разделение соединений проводили согласно модифицированной методике [16] на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, USA) (система подачи и дегазации на два растворителя, диодно-матричный детектор, термостат колонок, автосамплер) под управлением программного обеспечения – Agilent ChemStation Rev. A.09.0. В эксперименте использовалась хроматографическая колонка Atlantis dc18, 100 Å, 5 мкм, 4,6×250 мм. Температура колонки – 35 °С. Подвижная фаза «А» – метанол – ацетонитрил в соотношении 15:75. Подвижная фаза «Б» – 0,1% раствор муравьиной кислоты. Режим элюирования – градиентный (таблица 1). Скорость потока элюента – 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа – 75 мин. Детектирование осуществляли при длине волны 350 нм. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Условия хроматографирования для определения арбутина по модифицированной методике [17] были следующие: температура колонки – 40 °С; подвижная фаза: 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил (92:8); режим элюирования – изократический; скорость потока элюента – 1,0 мл/мин; продолжительность анализа – 10 мин; детектирование осуществляли при длине волны 210 нм; объем вводимой пробы – 10 мкл.

Таблица 1. Схема градиентного элюирования фенольных соединений

Table 1. The gradient elution mode of phenolic compounds

Время, мин	А, %	Б, %
0	0	100
10	27	73
20	27	73
70	60	40
75	0	100

Принадлежность к классу фенольных соединений оценивали на основании способности соединения поглощать при длине волны 350 нм. Хроматограммы снимали при длинах волн 350, 300, 270, 210 нм. Идентификацию индивидуальных соединений проводили на основе соответствия временам удерживания и УФ-спектрам стандартных образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований на ВЭЖХ-УФ хроматограмме ($\lambda=350$ нм) сухого экстракта было обнаружено присутствие 34 компонентов, водного извлечения сбора – 58. Из них идентифицировано 8 соединений: рутин, арбутин, ликуразид, ликвиритин, кверцетин, хлорогеновая, кофейная и галловая кислоты. Хроматограммы приведены на рисунке 1. Такое отличие в компонентном составе может быть связано с тем, что сбор и экстракт приготовлены из разных партий лекарственного растительного сырья. В зависимости от района и времени заготовки, условий произрастания и др. параметров, содержание действующих веществ может варьировать, а также технологические условия получения настоя ГС № 4 и сухого экстракта различны. Соединения, выбранные нами в качестве маркерных найдены как в сборе, так и в экстракте.

Количественное содержание (%) веществ фенольной природы в исследуемых образцах определяли методом внешнего стандарта. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2. К индикаторным компонентам можно отнести: арбутин, хлорогеновую кислоту и рутин. Арбутин относится к высокоспецифическим веществам-маркерам для данного сбора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучен компонентный состав фенольных соединений грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. Исследования показали, что в сборе обнаружено 58 соединений, в экстракте – 34, из которых идентифицировано 8 веществ. Среди них присутствовали флавоноиды (рутин, ликуразид, ликвиритин, кверцетин), гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая и кофейная кислоты), фенолокислоты (галловая кислота), фенологликозиды (арбутин). Содержание найденных со-

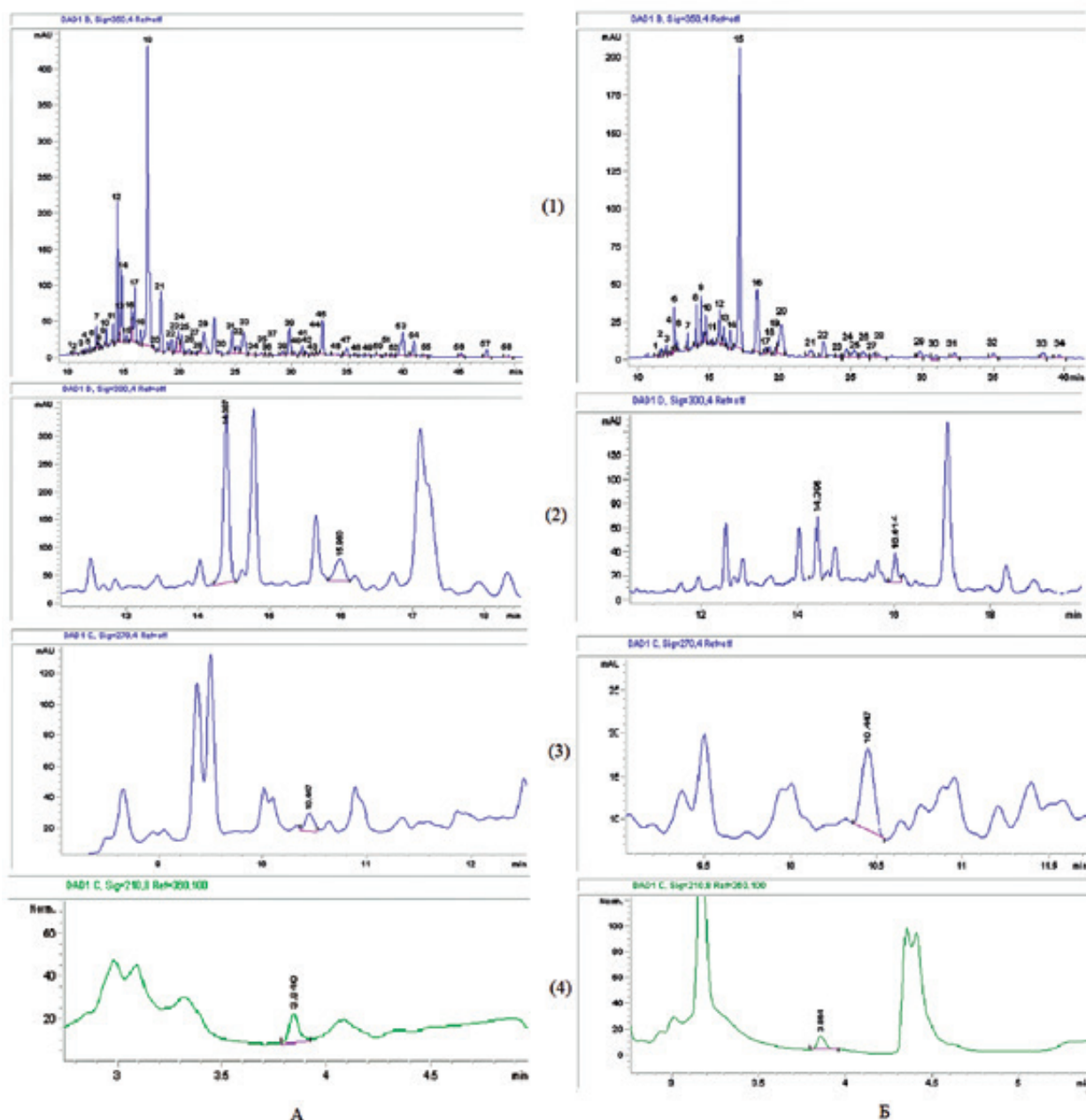


Рисунок 1. Хроматографический профиль фенольных соединений водного извлечения грудного сбора № 4 (А) и сухого экстракта (Б)

1 – ВЭЖХ-УФ хроматограммы при $\lambda=350$ нм; 2 – ВЭЖХ-УФ хроматограммы хлорогеновой (время удерживания – 14,39 мин) и кофейной (время удерживания – 16,00 мин) кислот при $\lambda=300$ нм; 3 – ВЭЖХ-УФ хроматограммы галловой кислоты при $\lambda=270$ нм; 4 – ВЭЖХ-УФ хроматограммы арбутина при $\lambda=210$ нм

Figure 1. Chromatographic profile of pectoral species № 4 (A) and dry extract (B) phenolic compounds

1 – HPLC-UV chromatograms at $\lambda=350$ nm; 2 – HPLC-UV chromatograms of chlorogenic (retention time, t_R – 14.39 min) and caffeic (t_R – 16.00 min) acids at $\lambda=300$ nm; 3 – HPLC-UV chromatograms of gallic acid at $\lambda=270$ nm; 4 – HPLC-UV chromatograms of arbutin at $\lambda=210$ nm

единений варьировало в диапазоне 0,001–0,910%. К мажорным компонентам можно отнести арбутин, хлорогеновую кислоту и рутин, концентрации которых составили: арбутина – $0,220 \pm 0,007\%$ в сборе и $0,910 \pm 0,029\%$ в экстракте; хлорогеновой кислоты – $0,095 \pm 0,003\%$ в сборе и $0,112 \pm 0,004\%$ в экстракте, рутина – $0,066 \pm 0,003\%$ в сборе и $0,217 \pm 0,009\%$ в экстракте. Эти соединения предложено использовать в качестве веществ-маркеров при сквозной стандартизации сбо-

ра и ЛФ на его основе, что хорошо согласуется с литературными данными [9, 12].

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование поддерживается «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

Таблица 2. Содержание фенольных соединений в грудном сборе № 4 и экстракте на его основе (n=5, $P_x=0,95$, $t(p, f)=2,776$)

Table 2. The content of phenolic compounds in pectoral species № 4 and its dry extract (n=5, $P_x=0,95$, $t(p, f)=2,776$)

Фенольное соединение	Время удерживания, мин	λ, нм	Содержание, %	
			Сбор	Экстракт
Флавоноиды				
Рутин	18,29	350	0,066± 0,003	0,217± 0,009
Ликуразид	30,87	350	0,013± 0,001	0,036± 0,002
Ликвиритин	32,17	350	0,0026± 0,0001	0,025± 0,001
Кверцетин	38,65	350	0,0013± 0,0001	0,015± 0,001
Гидроксикоричные кислоты				
Хлорогеновая кислота	14,39	300	0,095± 0,003	0,112± 0,004
Кофейная кислота	16,00	300	0,018± 0,001	0,061± 0,002
Фенолокислоты				
Галловая кислота	10,41	270	0,0113± 0,0003	0,056± 0,002
Фенологликозиды				
Арбутин	3,85	210	0,220± 0,007	0,910± 0,029

Примечание: n – число повторных испытаний; P_x – доверительная вероятность; $t(p, f)$ – критерий Стьюдента.

Note: n – number of repeat tests; P_x – confidence figure; $t(p, f)$ – Student's coefficient.

ЛИТЕРАТУРА

- Широкова И. Рынок растительных фитопрепаратов – тенденции, проблемы, прогнозы. *Ремедиум*. 2013; 4: 26–32.
- Русакова О. А., Ральченко И. В., Герберт И. Я., Вердиева С. И. Изучение аптечного ассортимента фитопрепаратов. *Фармация и фармакология*. 2015; 6(13): 54–59. DOI:10.19163/2307-9266-2015-3-6(13)-54-59
- Шилина Т. С., Ермакова В. А., Самылина И. А., Бардаков А. И. Разработка технологии получения сухого экстракта из грудного сбора № 3 и исследование его фенольного комплекса. *ВЕСТНИК ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2004; 2: 282–287.
- Самылина И. А., Блинова О. А., Кумышева Л. А., Марченко С. Д., Иванов А. И. Перспективы создания сухих экстрактов. *Фармация*. 2006; 2: 43–46.
- Филиппова И. Рынок растительных средств: проблемы, перспективы, приоритеты. *Ремедиум*. 2016; 7-8: 15–16.
- Регистр лекарственных средств России. Available at: <https://www.rlsnet.ru/>
- Буданцев А. Л. (Ред.). Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК. 2009; 2: 513.
- Буданцев А. Л. (Ред.). Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК. 2010; 3: 601.
- Амосов В. В. Исследование химического состава и фармакологических свойств грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе: дисс. ... канд. фарм. наук. ГОУВПО Тверская государственная медицинская академия Росздрава. Тверь. 2009; 159.
- Скибина А. А., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. Современные требования к стандартизации грудных сборов, их компонентов и лекарственных средств на их основе. *Традиционная медицина*. 2019; 1: 30–39.

- Скибина А. А., Гравель И. В., Самылина И. А., Ермакова В. А. Идентификация фенольных соединений в грудном сборе № 4 и сухом экстракте. Перспективы лекарственного растениеводства: сб. науч. трудов. М.: ВИЛАР. 2018; 545–547.
- Бубенчиков Р. А., Дроздова И. Л. Флавоноиды фиалки трехцветной. *Фармация*. 2004; 2: 11–12.
- Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 74(4): 418–425. DOI: 10.1093/ajcn/74.4.418.
- Serafini M., Peluso I., Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010; 69(3): 273–278. DOI: 10.1017/S002966511000162X.
- Временная фармакопейная статья 42-2688-96. Сбор грудной № 4.
- Xu Q. A. Ultra-high performance liquid chromatography and its applications. *John Wiley & Sons*. 2013; 17. DOI: 10.1002/9781118533956
- Pandey R., Kumar B., Meena B., Srivastava M., Mishra T., Tiwari V., Pal M., Nair N. K., Upreti D. K., Rana T. S. Major bioactive phenolics in *Bergenia* species from the Indian Himalayan region: Method development, validation and quantitative estimation using UHPLC-QqQ_{LT}-MS/MS. *PloS one*. 2017; 12(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0180950.

REFERENCES

- Shirokova I. The market of herbal medicines: trends, challenges and forecasts. *Remedium*. 2013; 4: 26–32 (in Russ.).
- Rusakova O. A., Ralchenko I. V., Gerbert I. Ya., Verdiev S. I. The study for the pharmacy range of herbal medicinal products. *Farmatsiya i farmakologiya*. 2015; 6(13): 54–59 (in Russ.). DOI:10.19163/2307-9266-2015-3-6(13)-54-59
- Shilina T. S., Ermakova V. A., Samylin I. A., Bardakov A. I. Development of pectoral species № 3 dry extract formulation and the study of its phenolic complex. *VESTNIK VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2004; 2: 282–287 (in Russ.).
- Samylin I. A., Blinova O. A., Kumysheva L. A., Marchenko S. D., Ivanov A. I. Prospects for designing dry extracts. *Farmatsiya*. 2006; 2: 43–46 (in Russ.).
- Filippova I. The market of herbal medicines: problems, perspectives, priorities. *Remedium*. 2016; 7-8: 15–16 (in Russ.).
- Register of medicines of Russia. Available at: <https://www.rlsnet.ru/>
- Budantsev A. L. (Ed.). Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. St. Petersburg; Moscow: KMK Scientific Press Ltd., 2009; 2: 513 (in Russ.).
- Budantsev A. L. (Ed.). Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. St. Petersburg; Moscow: KMK Scientific Press Ltd., 2010; 3: 601 (in Russ.).
- Amosov V. V. The study of the chemical composition and pharmacological properties of pectoral species № 4 and dry extract based on it. PhD dissertation. *The Tver State Medical Academy*. Tver. 2009; 159 (in Russ.).
- Skibina A. A., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylin I. A. Current requirements to the pectoral species, their components and medicinal preparation standardization. *Traditional medicine*. 2019; 1: 30–39 (in Russ.).
- Skibina A. A., Gravel I. V., Samylin I. A., Ermakova V. A. Identification of phenolic compounds in pectoral species № 4 and dry extract. *Perspektivy lekarstvennogo rastenievovedeniya: sbornik nauchnykh trudov*. Moscow: VILAR. 2018; 545–547 (in Russ.).
- Bubenchikov R. A., Drozdova I. L. Flavonoids of garden violet (*Viola tricolor*). *Farmatsiya*. 2004; 2: 11–12 (in Russ.).
- Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 74(4): 418–425. DOI: 10.1093/ajcn/74.4.418
- Serafini M., Peluso I., Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010; 69 (3): 273–278. DOI: 10.1017/S002966511000162X
- Temporary pharmacopoeial monograph 42-2688-96. Pectoral species № 4 (in Russ.).
- Xu Q. A. Ultra-high performance liquid chromatography and its applications. *John Wiley & Sons*. 2013; 17. DOI: 10.1002/9781118533956
- Pandey R., Kumar B., Meena B., Srivastava M., Mishra T., Tiwari V., Pal M., Nair N. K., Upreti D. K., Rana T. S. Major bioactive phenolics in *Bergenia* species from the Indian Himalayan region: Method development, validation and quantitative estimation using UHPLC-QqQ_{LT}-MS/MS. *PloS one*. 2017; 12 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0180950.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-103-107
УДК 543.253:(0888)

Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии

Н. О. Ким^{1*}, Е. А. Ивановская¹

1 – ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, д. 52

* Контактное лицо: Ким Надежда Олеговна. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. Тел.: 8 (383) 226 98 11.

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 17.05.2019

Резюме

Введение. В статье представлены данные по количественному определению ртути в водном растворе фармацевтической субстанции протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополлимерной композицией. Существующая методика определения примеси ртути в протамине сульфат согласно Европейской фармакопее – многостадийное титрование с дитизоном – трудоемка и не позволяет достичь воспроизводимости.

Цель. Проведение анализа содержания примеси биоаккумуляционной ртути в растворе протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии.

Материалы и методы. Субстанция протамина сульфата (Производитель Альпс Фармасьютикал Индастри Ко.Лтд). Экспериментальные данные получены на полуавтоматическом анализаторе ТА-4 (ООО НПП «Томьяналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте.

Результаты и обсуждение. Адаптирована методика определения ртути в воде и представлены результаты ее апробации на растворе протамина сульфат. Приведены результаты проверки работы электродов методом «введено-найденно», полученные результаты единичного анализа ртути входили в интервал 0,0038–0,0063 мг/л, что подтверждает их готовность к работе. Данный интервал прописан в методике и означает границы допустимых отклонений. Пределы обнаружения ртути на приборе составляют 10^{-6} – 10^{-10} моль/л. Из исследуемой нами субстанции протамина сульфат мы приготовили раствор с концентрацией 10 мг/мл и произвели измерения на подготовленных к работе электродах. Содержание ртути в исследуемой пробе составило 0,00034 мг/л. Согласно сертификату анализа на продукт протамина сульфата содержание ртути должно быть ≤ 10 мд. Было изучено влияние изменения времени накопления. Оптимальное время накопления составило 80 с, поскольку при стандартных условиях ртуть не вся успевает сконцентрироваться на поверхности электрода, а выше 80 с не происходит существенного увеличения содержания ртути.

Заключение. Предложенная методика определения ртути в воде методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополлимерной композицией может быть адаптирована для определения биоаккумуляционной ртути в фармацевтической субстанции протамина сульфат. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод можно применять в контроле качества лекарственных средств, как альтернативный экспресс-метод для определения примеси ртути существующему методу многостадийного титрования с дитизоном.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, ртуть, протамина сульфат.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Ким Н. О., Ивановская Е. А. Определение микропримесей ртути в лекарственном средстве протамина сульфат методом инверсионной вольтамперометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 103–107.

Determination of Mercury Impurities in Protamine Sulfate Medicament by Stripping Voltammetry

N. O. Kim^{1*}, E. A. Ivanovskaja¹

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Novosibirsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 52, Krasny prospect, Novosibirsk, 630091, Russia

*Corresponding author: Nadezhda O. Kim. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru. Tel.: 8 (383) 226 98 11.

Received: 05.10.2018. Accepted: 17.05.2019

Abstract

Introduction. The article presents data of the quantitative mercury determination in an aqueous solution of the pharmaceutical substance protamine sulfate by stripping voltammetry on graphite electrodes modified with a gold-polymer composition. The existing method to determine the mercury impurity in protamine sulfate according to the European Pharmacopoeia – multistage titration with dithizone – is laborious and does not allow to achieve repeatability.

Aim. Analyzing the content of bioaccumulative mercury impurities in a protamine sulfate solution by stripping voltammetry.

Materials and methods. Protamine Sulfate Substance (Manufacturer Alps Pharmaceutical Industry Co.Ltd). Experimental data were obtained on a TA-4 semi-automatic analyzer (OOO NPP Tomianalit, Tomsk) with VALabTx software.

Results and discussion. We adapted the method for mercury determination in water and presented the results of its testing on protamine sulfate solution. The results of testing the electrode operation using the «entered-found» method are given, the results of a single mercury analysis were included in the interval 0, 0038–0,0063 mg/l, which confirms their readiness for work. This interval is registered in the methodology and means the limits of permissible deviations. The limits of detection of mercury on the device are 10^{-6} – 10^{-10} mol/l. We prepared a solution with concentrations of 10 mg/ml from the protamine sulfate substance and measured it on prepared electrodes. The mercury content in the test sample was 0.00034 mg/l. According to the certificate of protamine sulfate, the mercury content should be ≤ 10 ppm. We studied the effect in changing of accumulation time. The optimal accumulation time was 80 seconds, because under standard conditions, not all mercury concentrates on the electrode surface, and above 80 seconds there is no significant increase in mercury content.

Conclusion. The proposed method for mercury determination in water by stripping voltammetry on graphite electrodes modified with a gold-polymer composition can be adapted to determine bioaccumulative mercury in the pharmaceutical substance protamine sulfate. The findings suggest that this method can be used in quality control of medicines, as an alternative express method for mercury impurities determination to the existing multistage titration method with dithizone.

Keywords: pectoral species, dry extract, phenolic compounds, HPLC, standardization.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Kim N. O., Ivanovskaja E. A. Determination of mercury impurities in protamine sulfate medicament by stripping voltammetry. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 103–107.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее вредных загрязнений для биосферы Земли, имеющих разнообразные вредные последствия, как для здоровья людей, так и для жизнедеятельности живых организмов, являются загрязнения тяжелыми металлами [1]. Ртуть – один из наиболее токсичных элементов, широко используемых в различных областях науки и техники. Большой интерес к проблеме определения ртути вызван ее миграцией в объектах окружающей среды, способностью к биоаккумуляции в живых организмах и в созданных на их основе лекарственных препаратах [2]. Одним из таких препаратов является протамина сульфат, который получают из субстанции рыбных протаминов сальмина и клупина [3, 4].

Известно, что токсичные эндогенные формы ртути поступают к человеку с морепродуктами и гидробионтами, образуясь в результате деятельности живых клеток и трансформации экзогенных форм при взаимодействии с макромолекулами (протеинами, аминокислотами и другими биологическими структурами), а также низкомолекулярными органическими лигандами [2]. В технологии изготовления протамина сульфат так же предполагается наличие ртути в микродозах. Поэтому в соответствии с современными представлениями, оценка безопасности лекарственного препарата органического происхождения должна учитывать все потенциальные факторы риска, специфичные для данной группы лекарственных средств. В связи с этим определение примеси ртути в субстанции протамина сульфата, широко применяющегося в клинической практике, является важным моментом на этапе входного контроля.

Современный уровень развития науки и техники требования к методам анализа следовых количеств токсических веществ постоянно повышаются. Высокая токсичность ртути обуславливает ее низкие значения ПДК, что требует применения чувствительных методов аналитической химии. Поиск нового метода определения ртути в протамина сульфат обусловлен тем, что существующая методика, предложенная в Европейской фармакопее [5] – титрование с дитизином – является достаточно трудоемкой.

Одним из методов, отвечающим требованиям определения ртути по пределу обнаружения и диапа-

зону определяемых концентраций, является инверсионная вольтамперометрия [6]. Инверсионная вольтамперометрия не является фармакопейным методом и используется для определения достаточно малых количеств концентрации вещества. Суть метода заключается в предварительном накоплении анализируемого вещества путем электролиза на электроде с последующим электрохимическим его растворением при линейно снижающемся потенциале. Предварительное накопление производится катодной поляризацией на стационарном электроде (для определения катионов) с последующим анодным растворением [7].

При определении низких концентраций ртути методом катодной вольтамперометрии на углеродном электроде возрастают трудности образования новой фазы на поверхности твердого электрода, что делает невозможным определение микродоз. Известно, что в некоторых случаях модифицирование поверхности электрода позволяет снизить определяемую концентрацию металла. В частности, в работе [8] изучено влияние металлов-модификаторов углеродных электродов Au, Cu, Ti, Cd при определении ртути методом анодной инверсионной вольтамперометрии и установлено, что использование золота позволяет получить условия устойчивого определения ртути на уровне низких концентраций (до 0,02 мкг/л).

В статье [9] показано, что на графитовом электроде из растворов, содержащих менее $4 \cdot 10^{-7}$ г-ион/л Hg^{2+} , последняя вообще не выделяется, если при этом не происходит одновременное осаждение некоторых металлов, в частности меди, свинца или кадмия, которые, вероятно, играют роль центров осаждения ртути.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение анализа содержания примеси биоаккумуляционной ртути в растворе протамина сульфата методом инверсионной вольтамперометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта мы использовали субстанцию Протамина сульфат. Производитель Альпс Фармасьютикал Индастри Ко.Лтд, 10-50, Furukawacho Mukaimachi Nichome, Hida, Gifu, 509-4241, Japan, Япония.

Нормативная документация: ФС 001078-211216, 2016, Протамина сульфат.

Образец предназначен в целях разработки, исследований, контроля безопасности, качества и эффективности лекарственных средств в рамках осуществления государственной регистрации лекарственного препарата; 1800 грамм, серия 515091, 514061, 514111.

Измерения проводили на электрохимическом анализаторе TA-4 (ООО НПП «Томьаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплексе методом вольтамперометрии путем регистрации поляризационных кривых с предварительным электрохимическим накоплением ртути на поверхности электрода в стандартных условиях согласно методике вольтамперометрического определения ртути в водных растворах [10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно методики поверхность углеродсодержащего электрода электрохимически покрывали золотом из раствора ГСО хлорида золота (III) с концентрацией 500 мг/л изготовленного из раствора ГСО золота концентрации 10000 мг/л (ГСО 8429-2003). В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод.

Проверка работы золотоуглеродсодержащего электрода проводилась по следующей методике. Сначала проводили отмывку стаканчиков и электродов. Для этого вносили в стаканчики 10 мл бидистиллированной воды, затем добавляли 20 мкл HNO_3 (конц.) и нажимали кнопку «отмывка» в программе. Потом снимали чистый фон [с добавлением 20 мкл 0,1 М хлорида калия и 20 мкл HNO_3 (конц.)] (рисунок 1а). Отсутствие пиков на вольтамперограммах и значение высоты пиков не превышающее 5 нА свидетельствуют о чистоте фона. После этого добавляли 50 мкл пробы – приготовленный раствор 0,1 мг/л ртути из раствора ГСО. Отмечали наличие пика ртути в пределах от 0,35–0,65 В. (рисунок 1б). В конце добавляли добавку – 50 мкл 0,1 мг/л раствора ртути. При этом высота сигнала увеличивалась примерно в два раза (рисунок 1в).

Источником информации служили вольтамперограммы – для фона, пробы и добавки. Параметры стандартных измерений – время накопления 60 с, растворения 10 с, успокоения 5 с.

Некоторые результаты проверки готовности электродов к работе приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы результаты единичного анализа ртути перед началом измерений входят в интервал 0,0038–0,0063 мг/л – это значит, электроды готовы

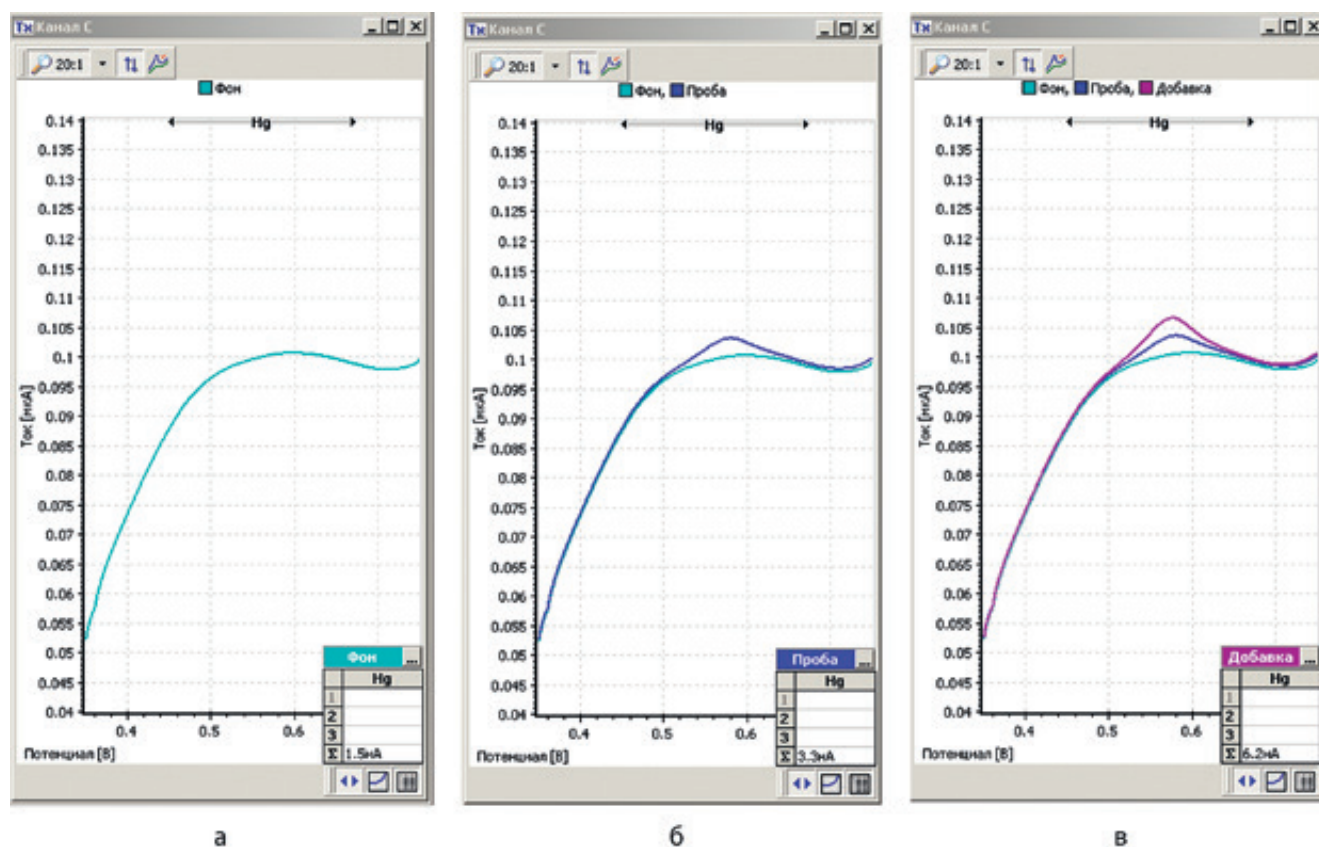


Рисунок 1. А – вольтамперограмма чистого фона (голубая линия); б – вольтамперограмма для пробы (синяя линия); в – вольтамперограмма с добавкой (розовая линия)

Figure 1. А – voltammogram of a clean background (blue line); б – voltammogram for the sample (blue line); в – voltammogram with additive (pink line)

к работе и на них можно производить дальнейшие измерения исследуемой субстанции. Электроды работают достаточно стабильно при правильной их подготовке к работе.

Таблица 1. Концентрация аттестованного раствора ртути 0,1 мг/л. Объем добавки – 50 мкл. Объем аликвоты – 50 мкл

Table 1. Concentration of a certified mercury solution of 0.1 mg/l. The volume of the additive is 50 µl. The aliquot volume is 50 µl

№	Средняя высота пика фона, нА	Средняя высота пика пробы, нА	Средняя высота пика с добавкой, нА	Результат, мг/л
1	1,23	3,73	6,87	0,0039
2	1,67	4,87	8,47	0,0044
3	0,83	2,83	5,23	0,0038
4	1,83	4,03	6,60	0,0047
5	1,3	3,93	6,80	0,0053
6	1,95	3,35	5,15	0,0053
7	0,77	1,87	3,30	0,0044
8	1,47	3,13	6,53	0,0045
9	2,26	4,15	6,15	0,0046
10	2,37	3,35	5,15	0,0038

Расчет результатов анализа производились в автоматическом режиме. Прибор считает по специальной формуле, в которой учитывается разница высоты пиков ртути на кривых с добавкой и без, а также с учетом фона.

$$C_{\text{в пробе}} = \frac{I_{\text{пробы}} \cdot C_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{минерализата}}}{(I_{\text{проба с добавкой}} - I_{\text{проба}}) \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot M_{\text{навески}}},$$

где $I_{\text{пробы}}$ – высота пика элемента на кривой пробы, мкА; $C_{\text{добавки}}$ – концентрация аттестованного раствора, мг/л; $V_{\text{добавки}}$ – объем добавки, мл; $V_{\text{минерализата}}$ – объем минерализата, мл; $I_{\text{проба с добавкой}}$ – высота пика элемента на кривой пробы с добавкой, мкА; $V_{\text{аликвоты}}$ – объем аликвоты, мл; $M_{\text{навески}}$ – величина навески, г или мл.

Для начала определили содержание ртути в холостой пробе (бидистиллированная вода), а затем проводили анализ на содержание ртути в объекте исследования.

Для исследования из субстанции протамина сульфат готовили водный раствор с концентрацией 10 мг/мл.

Результаты исследования приведены на вольтамперограмме (рисунок 2).

Как видно из вольтамперограммы в исследуемой пробе присутствует ртуть, но измерения при стандартных параметрах давали очень слабый сигнал, поэтому было изучено влияние изменения времени накопления. Объем аликвоты (исследуемый раствор) – 50 мкл. Объем добавки (аттестованный раствор ртути

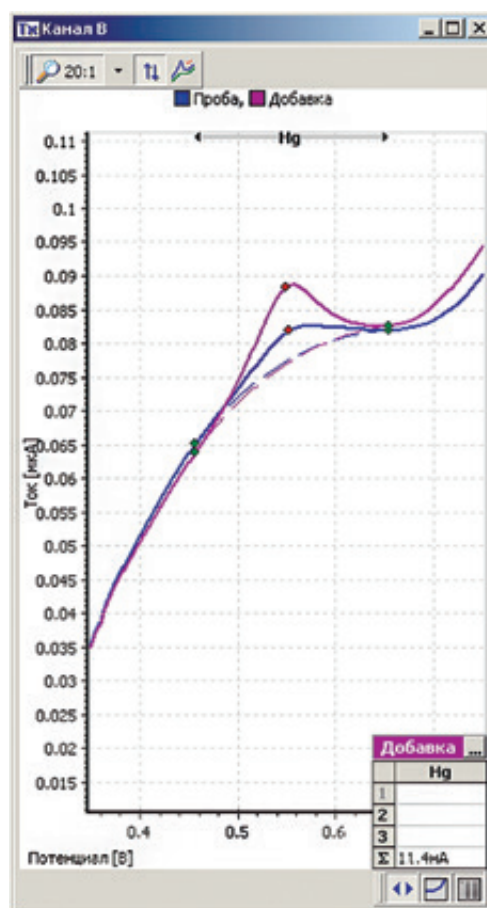


Рисунок 2. Вольтамперограмма протамина сульфат (нижняя кривая – проба протамина сульфат, верхняя кривая – добавка ГСО ртути)

Figure 2. Protamine sulfate voltammogram (the lower curve is a sample of protamine sulfate, the upper curve is the addition of GSO mercury)

с концентрацией 0,1 мг/л) – 50 мкл. Время накопления увеличивали от до 60 до 120 с интервалом 20 секунд. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание ртути в растворе протамина сульфата в зависимости от времени накопления

Table 2. The mercury content in the solution of protamine sulfate, depending on the accumulation time

№	Время накопления, с	Содержание ртути, мг/л	SR, стандартное отклонение
1	60	0,00027	0,00004
2	80	0,00044	0,00002
3	100	0,00047	0,00005
4	120	0,00045	0,00007

Из таблицы видно, что при стандартных условиях ртуть не вся успевает сконцентрироваться на поверхности электрода, а выше 80 секунд не происходит существенного увеличения содержания ртути при средней ее концентрации в растворе протамина сульфата 0,0453 мкг/л, что ниже предельно допустимой нормы (10 мкг/л).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований, можно сделать заключение, что методика определения ртути в воде методом инверсионной вольтамперометрии на графитовых электродах, модифицированных золотополимерной композицией может быть адаптирована для определения биоаккумуляционной ртути в фармацевтической субстанции протамина сульфат. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод можно применять в контроле качества лекарственных средств, как альтернативный экспресс-метод для определения примеси ртути существующему методу многостадийного титрования с дитизионом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузубова Л. И., Шуваева О. В., Аношин Г. Н. Метилртуть в окружающей среде (распространение, образование в природе, методы определения). Новосибирск: ГПНТБ СО РАН. 2000; 82.
2. Петросян В. С. Ртуть и ее соединения в окружающей среде // Человек и среда его обитания. М.: Мир. 2003; 282–290.
3. Eirin-Lopez J. M., Frehlick L. J., Ausio J. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21–24.
4. Frehlick L. J., Eirin-Lopez J. M., Prado A., Su H. W., Kasinsky H. E., Ausio J. Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of Scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastolobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006; 305: 277–287.
5. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
6. Шелковников В. В., Анищенко М. В., Шульга А. Н., Минаев К. М. Графитовые электроды, модифицированные золотополимерной композицией, для определения ртути методом инверсионной вольтамперометрии. *Вестник Томского государственного университета.* 2013; 368: 204–207.
7. Хенце Г. Полярграфия и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика / Пер. с нем. А. В. Гармаша и А. И. Каменева. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2008; 284.
8. Ларина Л. Н. ИВА определение ртути в объектах окружающей среды на модифицированных металлами углеродных электродах: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Томск. 2004; 23.
9. Матвейко Н. П., Брайкова А. М., Бушило К. А., Садовский В. В. Инверсионно-вольтамперометрический контроль содержания тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе. *Вестник витебского государственного технологического университета.* 2016; 1(30): 82–85.
10. Галимова В. Электрохимический контроль микроколичеств ртути в воде. *Вестник Львовского университета. Серия химическая.* 2016; 57(2): 588–592.
11. ФР.1.31.2005.01450 «Воды природные, питьевые, технологически чистые, очищенные сточные. Вольтамперометрический метод измерения массовой концентрации ртути». Томск. 2004.

REFERENCES

1. Kuzubova L. I., Shuvaeva O. V., Anoshin G. N. Methylmercury in the environment (distribution, education in nature, methods of determination). Novosibirsk: GPNTB so ran. 2000; 82.
2. Petrosyan V. S. Mercury and its compounds in the environment // Man and his environment. M.: World. 2003; 282–290.
3. Eirin-Lopez J. M., Frehlick L. J., Ausio J. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21–24.
4. Frehlick L. J., Eirin-Lopez J. M., Prado A., Su H. W., Kasinsky H. E., Ausio J. Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of

Scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastolobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006; 305: 277–287.

5. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
6. Shelkovnikov V. V., Anishchenko M. V., Shulga A. N., Minaev K. M. Graphite electrodes modified by gold-polymer composition for mercury determination by inversion voltammetry. *Bulletin Of Tomsk State University.* 2013; 368: 204–207.
7. Henze G. Polarography and voltammetry. Theoretical foundations and analytical practice / translated from German V. A. Garmash, A. I. Kamenev. – M.: BINOM. Knowledge laboratory. 2008; 284.
8. Larina L. N. IVA determination of mercury in environmental objects on carbon electrodes modified by metals: autoref. dis. ... kand. chem. Sciences. Tomsk. 2004; 23.
9. Matveiko N. P., Braikova A. M., Bachilo K. A., V. V. Sadovskii K. A. Inversion-voltammetric monitoring of heavy metals in herbal drugs and preparations on its basis. *Vestnik of Vitebsk state technological University.* 2016; 1(30): 82–85.
10. Galimova V. Electrochemical control of micro-quantities of mercury in water. *Bulletin of Lviv University. Series chemical.* 2016; 57(2): 588–592.
11. ФР.1.31.2005.01450 «Vody prirodnye, pit'evye, tehnologicheski chistye, ochishhennye stochnye. Vol'tamperometricheskij metod izmerenija massovoj koncentracii rtuti». Tomsk, 2004.

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-108-114
УДК 615.03

Разработка и валидация методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека

Д. С. Богданова^{1*}, Т. Н. Комаров¹, И. Е. Шохин¹, Е. С. Мельников^{2,3}, О. А. Мискив¹,
Ю. В. Медведев^{1,3}

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

2 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

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

*Контактное лицо: Богданова Дана Салаватовна. E-mail: D.Bogdanova@cpha.ru

Статья получена: 30.04.2019. Статья принята к печати: 13.05.2019

Резюме

Введение. Тадалафил – лекарственный препарат, используемый для лечения эректильной дисфункции. Для количественного определения тадалафила в плазме крови человека при проведении аналитической части фармакокинетических исследований применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым и tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки применяется способ жидкость-жидкостной экстракции и в редких случаях применяют способ твердофазной экстракции. Данные способы являются в достаточной степени трудоёмкими и экономически затратными. Поэтому в настоящем исследовании в качестве пробоподготовки рассмотрен способ осаждения белков, являющийся более простым в исполнении, что актуально при анализе большого количества проб при проведении исследований биоэквивалентности.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение тадалафила в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00–1000,00 нг/мл тадалафила в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности воспроизводимых лекарственных средств, содержащих тадалафил.

Ключевые слова: тадалафил, плазма, ВЭЖХ-МС, количественное определение, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Богданова Д. С., Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мельников Е. С., Мискив О. А., Медведев Ю. В. Разработка и валидация методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(2): 108–114.

Development and Validation of Tadalafil Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method

D. S. Bogdanova¹, T. N. Komarov¹, I. E. Shohin¹, E. S. Melnikov¹, O. A. Miskiv¹, Yu. V. Medvedev^{1,2}

1 – LLC «CPhA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow, 11, Yauzskaya str. Moscow, 119027, Russia

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

*Corresponding author: Dana S. Bogdanova. E-mail: D.Bogdanova@cpha.ru

Received: 30.04.2019. Accepted: 13.05.2019

Abstract

Introduction. Tadalafil is a drug used to treat erectile dysfunction. For the quantitative determination of tadalafil in human plasma are used methods of high performance liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection, during the analytical part of pharmacokinetic studies. In the majority of the considered methods the method of liquid-liquid extraction and the method of solid-phase extraction are used, these methods are difficult and expensive. Therefore, the method of protein precipitation was considered as sample preparation. This method is simple and there is important to analysis a lot of clinical samples in bioequivalence studies.

Aim. The aim of this study is to develop method for the quantitative determination of tadalafil in human plasma by HPLC-MS for the analytical part of pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Quantitative determination of tadalafil in plasma by HPLC-MS. A sample was prepared using acetonitrile protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next validation parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the quantitative determination of tadalafil in human plasma was developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of the was 5,00–1000,00 ng/ml tadalafil in plasma. Method could be applied to determination of tadalafil in plasma for PK and BE studies.

Keywords: tadalafil, plasma, HPLC-MS, quantitative determination, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Bogdanova D. S., Komarov T. N., Shohin I. E., Melnikov E. S., Miskiv O. A., Medvedev Yu. V. Development and validation of tadalafil determination in human plasma by HPLC-MS method. *Drug development & registration.* 2019; 8(2): 108–114.

ВВЕДЕНИЕ

Тадалафил ((6R,12aR)-6-(1,3-Бензодиоксол-5-ил)-2-метил-2,3,6,7,12,12a-гексагидро метилпиразино[1',2':1,6]пиридо[3,4-b]индол-1,4-дион) – лекарственный препарат, используемый для лечения эректильной дисфункции. Тадалафил является обратимым селективным ингибитором специфической фосфодиэстеразы типа 5 (ФДЭ5) циклического гуанозин монофосфата (цГМФ). Структурная формула тадалафила приведена на рисунке 1.

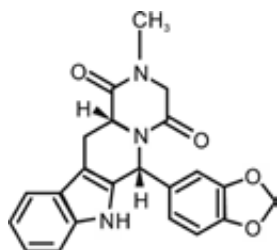


Рисунок 1. Структурная формула тадалафила

Figure 1. The structural formula of tadalafil

Фармакологическое действие тадалафила направлено на улучшение эректильной функции. Процесс эрекции опосредствован высвобождением оксида азота из нервных окончаний и эндотелиальных клеток пещеристых тел. Оксид азота стимулирует синтез циклического гуанозин монофосфата. При накоплении цГМФ происходит расслабление гладких мышц, что приводит к увеличению притока крови к кавернозным телам. Тадалафил ингибирует цГМФ-специфическую фосфодиэстеразу типа 5, которая ответственна за деградацию цГМФ в кавернозном теле. Ингибирование ФДЭ5 тадалафилем сопровождается увеличением количества цГМФ и усилением эректильной функции [1].

Отличительной фармакологической особенностью тадалафила является его более длительный период полувыведения (17,5 часа) по сравнению с силденафилом и варденафилом (4–5 часов). Данная особенность является основой современных исследований для использования тадалафила при легочной артериальной гипертензии в качестве терапии один раз в день [2].

Для количественного определения тадалафила в плазме крови человека применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) и tandemным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС). В большинстве рассмотренных методик в качестве пробоподготовки применяется способ жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), в редких случаях применяют способ твердофазной экстракции (ТФЭ) (таблица 1). Данные способы являются в достаточной степени трудоёмкими и экономически затратными (расход раствори-

телей, картриджей для ТФЭ). В настоящем исследовании в качестве пробоподготовки рассмотрен способ осаждения белков, являющийся более простым в исполнении, что актуально при анализе большого количества проб при проведении исследований биоэквивалентности. Данный способ пробоподготовки в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием позволяет достичь необходимого и достаточного уровня НПКО методики для проведения исследований биоэквивалентности.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения тадалафила

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of tadalafil

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	5,00–600,00	[3]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	10,00–1000,00	[4]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	10,00–2000,00	[5]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	2,00–1000,00	[6]
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	2,00–1000,00	[7]
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	5,00–1000,00	[8]

Целью исследования является разработка методики количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ с одноквадропольным масс-спектрометрическим детектированием, для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок, автосамплером и масс-спектрометрическим детектором 6125. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation, rev. C.01.07 Agilent Technologies, США.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы тадалафила (USP reference standard, содержание 99,9%) и пропранолола гидрохлорида (USP reference standard, содержание 99,9%).

Исходные стандартные растворы тадалафила и внутреннего стандарта (ВС) пропранолола готовили

путем растворения навески субстанций в ацетонитриле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре -45°C . Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре -45°C .

Пробоподготовка

В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков ацетонитрилом, поскольку данный способ является менее трудоемким и длительным по сравнению с ЖЖЭ и ТФЭ.

К 300 мкл испытуемой плазмы крови (либо к 270 мкл интактной плазмы с прибавлением 30 мкл рабочего стандартного раствора тадалафила), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта пропранолола (1000,00 нг/мл), затем прибавляли 900 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее надосадочную жидкость переносили в хроматографические флаконы.

Условия хроматографического разделения и детектирования

- ✓ Колонка: Phenomenex Luna C18, 50x4,6 мм, 5 мкм; предколонка: Phenomenex C18, 4x3,0 мм, 5 мкм.
- ✓ Температура термостата: 40°C .
- ✓ Подвижная фаза: элюент А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму), элюент В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- ✓ Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 1.

Таблица 2. Градиентное элюирование

Table 2. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	90	10	1,20
0,50	90	10	
5,00	58	42	
5,10	0	100	
5,90	0	100	
6,00	90	10	
7,00	90	10	

- ✓ Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- ✓ Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–7 мин.
- ✓ Положительная ионизация (тадалафил): (SIM), 390,2 m/z.
- ✓ Положительная ионизация (пропранолол): (SIM), 260,0 m/z.
- ✓ Параметры источника ионизации: распыляющий газ 250 кПА, осушающий газ 13 л/мин, температура источника 350°C , напряжение на капилляре 5 кВ.
- ✓ Время удерживания тадалафила: около 4,5 мин.
- ✓ Время удерживания пропранолола: около 2,5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [9], а также руководств FDA [10] и EMA [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных и рабочих растворов аналита и ВС; стабильность замороженного и размороженного аналита; краткосрочная стабильность аналита в матрице; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов тадалафила до концентрации 250,00 нг/мл, а также раствора внутреннего стандарта (пропранолола) до концентрации 30 нг/мл. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания тадалафила и пропранолола. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2, 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов тадалафила и пропранолола без влияния биологической матрицы (W_{y_x}), а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учёта влияния степени

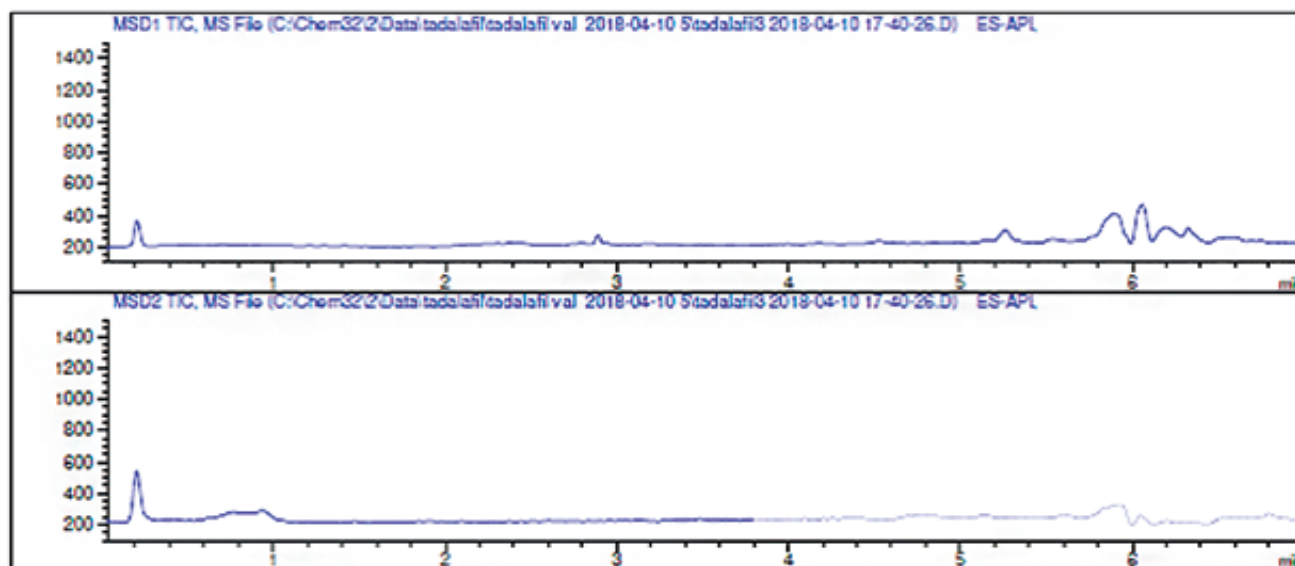


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Chromatogram of a blank plasma sample

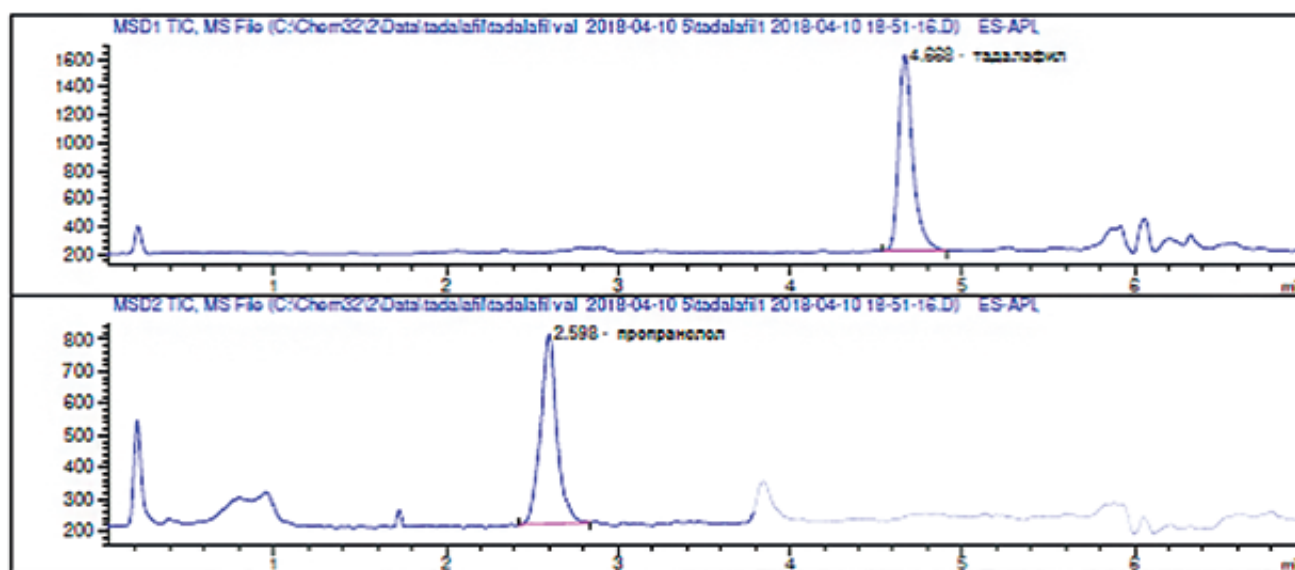


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови с прибавлением рабочего стандартного раствора до концентрации тадалафила 250,00 нг/мл и рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of a standard solution to concentration of tadalafil 250,00 ng/ml and standard solution to concentration of propranolol 30 ng/ml

извлечения тадалафила и пропранолола из биологической матрицы (SA_yx).

Эффект матрицы был оценен на нижнем и верхнем уровнях аналитического диапазона концентраций тадалафила (10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл). Для внутреннего стандарта (пропранолол) эффект матрицы был рассчитан на уровне 30 нг/мл. Данные представлены в таблицах 3–6.

Фактор матрицы рассчитывали, как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения

белков, к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали, как отношение значения фактора матрицы тадалафила к фактору матрицы пропранолола (внутренний стандарт). Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, соответствуют нормам, не более 15%.

Таблица 3. Расчёт влияния биологической матрицы на количественное определение тадалафила 10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл

Table 3. The effect of the biological matrix on the quantitative determination of tadalafil 10,00 ng/ml and 1000,00 ng/ml

Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора без влияния биологической матрицы	Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора, приготовленного на интактной плазме	Mf
W_2_1	375	SA_2_1	293	0,78
W_2_2	348	SA_2_2	299	0,86
W_2_3	305	SA_2_3	317	1,04
W_2_4	380	SA_2_4	317	0,83
W_2_5	397	SA_2_5	345	0,87
W_2_6	320	SA_2_6	263	0,82
W_9_1	33541	SA_9_1	31535	0,94
W_9_2	32954	SA_9_2	31122	0,94
W_9_3	33035	SA_9_3	31178	0,94
W_9_4	33441	SA_9_4	31983	0,96
W_9_5	34510	SA_9_5	31783	0,92
W_9_6	33689	SA_9_6	31577	0,94

Таблица 4. Расчёт влияния биологической матрицы на количественное определение пропранолола 30 нг/мл

Table 4. The effect of the biological matrix on the quantitative determination of propranolol 30 ng/ml

Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора без влияния биологической матрицы	Код пробы	Площадь пика на хроматограмме раствора, приготовленного на интактной плазме	Mf
W_2_1	4614	SA_2_1	4354	0,94
W_2_2	4583	SA_2_2	4355	1,05
W_2_3	4457	SA_2_3	4352	0,98
W_2_4	4537	SA_2_4	4340	0,96
W_2_5	4479	SA_2_5	4402	0,98
W_2_6	4511	SA_2_6	4405	0,98
W_9_1	4412	SA_9_1	4371	0,99
W_9_2	4392	SA_9_2	4518	1,03
W_9_3	4365	SA_9_3	4550	1,04
W_9_4	4521	SA_9_4	4543	1,00
W_9_5	4410	SA_9_5	4500	1,02
W_9_6	4132	SA_9_6	4463	1,08

Калибровочная кривая

Проводили анализ 9 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл и рабочих стандартных растворов тадалафила до получения концентраций: 5,00 нг/мл, 10,00 нг/мл, 25,00 нг/мл, 50,00 нг/мл, 100,00 нг/мл, 250,00 нг/мл, 500,00 нг/мл, 750,00 нг/мл, 1000,00 нг/мл (таблица 2). По полученным

значениям были построены калибровочные графики, приведенные на рисунке 4 совместно с уравнением калибровочной кривой.

Таблица 5. Расчёт фактора матрицы тадалафила (10,0 нг/мл), нормализованного по фактору матрицы пропранолола (30 нг/мл)

Table 5. The matrix factor of tadalafil (10,00 ng/ml), normalized by the matrix factor of propranolol (30 ng/ml)

№	Mf тадалафила	Mf пропранолола	Нормализованный Mf
1	0,78	0,94	0,83
2	0,86	1,05	0,82
3	1,04	0,98	1,07
4	0,83	0,96	0,87
5	0,87	0,98	0,88
6	0,82	0,98	0,84
Среднее			0,88
CV, %			10,44

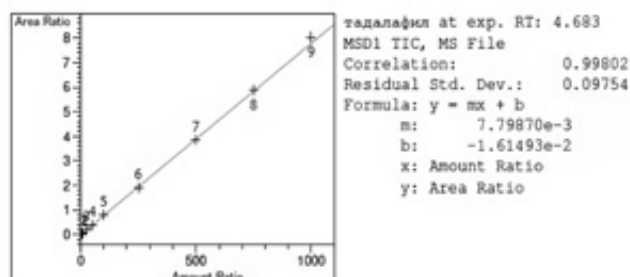


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика тадалафила к площади пика пропранолола от отношения концентрации тадалафила к концентрации пропранолола в плазме крови

Figure 4. The calibration curve dependence of the ratio area peak of tadalafil to the propranolol on the concentration ratio of tadalafil to the propranolol in plasma

Таблица 6. Расчёт фактора матрицы тадалафила (1000,00 нг/мл), нормализованного по фактору матрицы пропранолола (30 нг/мл)

Table 6. The matrix factor of tadalafil (1000,00 ng/ml), normalized by the matrix factor of propranolol (30 ng/ml)

№	Mf тадалафила	Mf пропранолола	Нормализованный Mf
1	0,94	0,99	0,95
2	0,94	1,03	0,92
3	0,94	1,04	0,91
4	0,96	1,00	0,95
5	0,92	1,02	0,90
6	0,94	1,08	0,87
Среднее			0,92
CV, %			3,45

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Отклонения концентраций тадалафила в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1 (тадалафил)

Table 7. Deviations of tadalafil concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration curve № 1 (tadalafil)

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма, не более %
5,00	5,28	5,31	20
10,00	9,76	-2,44	15
25,00	23,13	-8,06	15
50,00	47,17	-6,00	15
100,00	99,55	-0,45	15
250,00	264,21	5,38	15
500,00	500,33	0,07	15
750,00	711,86	-5,36	15
1000,00	1033,11	3,20	15

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов интактной плазмы крови с прибавлением стандартных растворов тадалафила до получения концентраций: 5,00 нг/мл, 10,00 нг/мл, 500,00 нг/мл, 1000,00 нг/мл и рабочего стандартного раствора пропранолола до концентрации 30 нг/мл. Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня концентраций тадалафила. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблицах 8–10.

Таблица 8. Точность и прецизионность методики (внутри цикла)

Table 8. Accuracy and precision of the method (inter-day)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	SD, (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %
5,00	5,97	0,06	1,01	19,42
10,00	9,83	0,90	9,20	-1,66
500,00	502,16	8,37	1,67	0,43
1000,00	1067,47	21,95	2,06	6,75

Таблица 9. Точность и прецизионность методики (между циклами 1)

Table 9. Accuracy and precision of the method (intra-day 1)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	SD, (n=10)	RSD, % (n=10)	E, %
5,00	5,81	0,26	4,49	16,20
10,00	9,79	0,79	8,08	-2,07
500,00	504,54	10,07	2,00	0,91
1000,00	1051,24	23,50	2,24	5,12

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% на уровне НПКО, не более 15% – для остальных точек).

Таблица 10. Точность и прецизионность методики (между циклами 2)

Table 10. Accuracy and precision of the method (intra-day 2)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=15)	SD, (n=15)	RSD, % (n=15)	E, %
5,00	5,56	0,35	6,30	11,13
10,00	9,63	0,94	9,77	-3,75
500,00	503,48	7,96	1,58	0,70
1000,00	1048,75	19,14	1,82	4,88

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация тадалафила в плазме крови в диапазоне линейной зависимости, для которой возможно количественное определение тадалафила со значениями RSD и E не более 20%.

Нижний предел количественного определения методики составил 5,00 нг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием тадалафила на уровне НПКО приведена на рисунке 5. Отношение сигнал/шум по пику тадалафила на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения ChemStation, составило 10,5. Предел обнаружения тадалафила для данной методики составил около 2,9 нг/мл.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-х кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 60 дней при температуре -45 °C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 60 дней при температуре -45 °C) тадалафила на уровне концентраций 10,00 нг/мл и 1000,00 нг/мл

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией тадалафила 1000,00 нг/мл, пропранолола 30 нг/мл и образца интактной плазмы на хроматограмме образца интактной плазмы отсутствовали пики, соответствующие тадалафилу и пропранололу, с площадью более чем 20% от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения тадалафила в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 5,00–1000,00 нг/мл тадалафила в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разра-

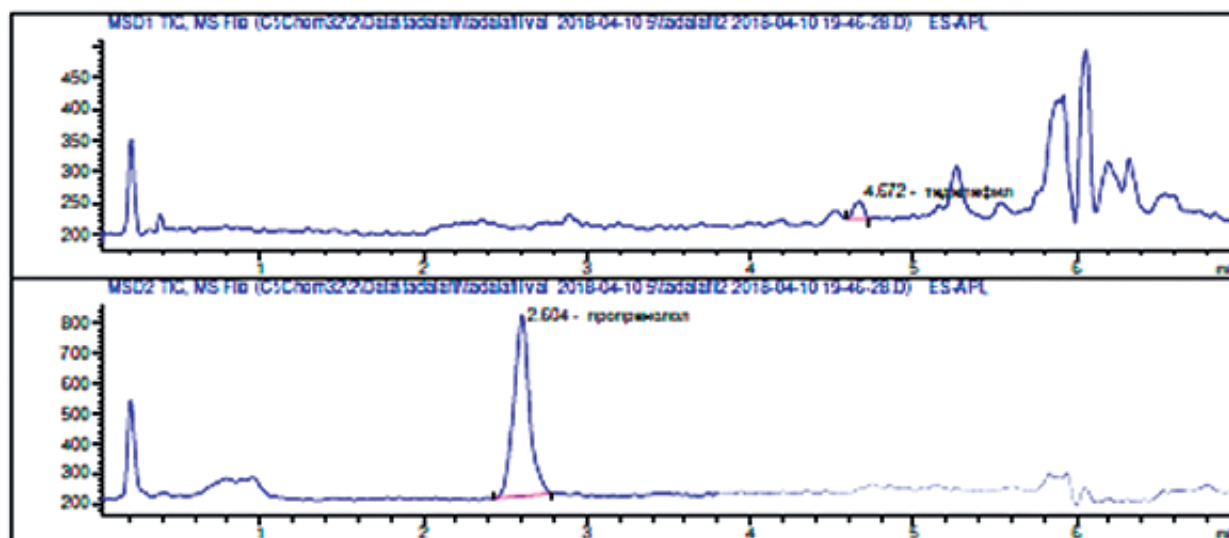


Рисунок 5. Хроматограмма образца интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов пропранолола и тадалафила на уровне НПКО

Figure 5. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of standard solutions of propranolol and tadalafil at the level LLOQ

ботанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности воспроизводимых лекарственных средств, содержащих тадалафил.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств. Available at: http://www.rlsnet.ru/mnn_index
2. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00820>.
3. Shakya A. K., Abu-Awwad A. N., Arafat T. A., Melhim M. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*. 2007; 852(1-2): 403–408. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.049.
4. Ramakrishna N. V. S., Vishwottam K. N., Puran, S., Koteswara M., Manoj S., Santosh, M., Sumatha B. Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*. 2004; 809(2): 243–249. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.06.026.
5. Cheng C. L., Chou C. H. Determination of tadalafil in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2005; 822(1-2): 278–284. Doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.017.
6. Ma B., Shang X., Zhang Q., Li J., Liu Y., Cao X., Xu Q. Rapid analysis of tadalafil in human blood plasma and seminal plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013; 77: 149–157. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.01.019.
7. Yokoyama Y., Tomatsuri M., Hayashi H., Hirai K., Ono Y., Yamada Y., Itoh K. Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014; 89: 227–232. Doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.007.
8. Rust K. Y., Wilkens H., Kaiser R., Bregel D., Wilske J., Kraemer T. Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in Human Blood Plasma by LC-MS/MS – Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases. *Therapeutic drug monitoring*. 2012; 34 (6): 729–735. Doi.org/10.1097/FTD.0b013e31827318b8.
9. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К. 2013; 280 с.
10. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
11. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-115-120
УДК 543.51; 543.544.5.068.7; 543.054

Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор)

И. И. Мирошниченко¹, Ю. Е. Шилов^{1*}

1 – ФГБУ «Научный центр психического здоровья», 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34

*Контактное лицо: Шилов Юрий Е. E-mail: shilov.biochem@gmail.com

Статья получена: 13.03.2019. Статья принята к печати: 27.05.2019

Резюме

Введение. В представленной публикации освещены ключевые моменты основных этапов разработки методик определения следовых количеств лекарственных веществ и метаболитов в биологических образцах с помощью хроматографических и хроматомасс-спектрометрических методов. Указаны главные источники ошибок. Основное внимание уделено хроматомасс-спектрометрии, которая является базовым методом анализа малых молекул в биологических образцах. Приведены примеры из литературных источников и собственной практики.

Текст. В обзоре освещены некоторые практические вопросы приготовления калибровочных образцов, способы повышения стабильности образца на этапе пробоотбора и получения плазмы. В частности, отражено влияние различных антикоагулянтов на правильность анализа, приведен способ снижения обратной конверсии некоторых метаболитов карбокси-содержащих лекарственных веществ в исходное соединение с целью предотвращения получения завышенных результатов количественного определения. Отмечены некоторые способы пробоподготовки, получающие широкое распространение последнее время, такие как жидкость-жидкостная экстракция в нанесенном слое, основанная на извлечении интересующего компонента из водного образца в слой жидкости, распределенной на твердом высокополярном носителе, с последующим элюированием системой неполярных растворителей, не смешивающихся с этим слоем. Даны рекомендации по использованию внутренних стандартов, приготовлению подвижной фазы для ВЭЖХ, по вопросам хроматографического разделения, валидации методик. В подразделе «Масс-спектрометрическое детектирование» приведены особенности приготовления подвижной фазы для хроматомасс-спектрометрических экспериментов. Освещены вопросы снижения переноса пробы, ионной супрессии, матричного эффекта. Обсужден феномен перекрестных помех при изучении метаболизма лекарственных веществ посредством хроматомасс-спектрометрии, который заключается во взаимном искажении масс-спектрометрического отклика, когда от разных по массе ионов-предшественников образуются одинаковые по массе фрагменты. Приведены особенности разработки методик в высокопроизводительном фармакокинетическом скрининге.

Заключение. Авторы выражают надежду, что представленный материал будет полезен для ученых и специалистов в области фармакокинетики, изучения биомаркеров и клинических анализов.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, количественное определение, пробоподготовка, стабильность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Мирошниченко И. И., Шилов Ю. Е. Анализ биологических образцов в современной лабораторной практике (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 115–120.

Analysis of Biological Samples in a Contemporary Laboratory Practice (Review)

I. I. Miroshnichenko¹, Y. E. Shilov^{1*}

1 – Mental Health Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, 34, Kashirskoye shosse, Moscow, 115522 Russia

*Corresponding author: Yuri E. Shilov. E-mail: shilov.biochem@gmail.com

Received: 13.03.2019. Accepted: 27.05.2019

Abstract

Introduction. In the present publication highlights the key points of the main stages of development of methods for determining trace amounts of drugs and metabolites in biological samples using chromatographic and chromatography-mass spectrometry methods. The main sources of errors are specified. The main attention is paid to chromatography-mass spectrometry, which is the basic method of analysis of small molecules in biological samples. Examples from literary sources and authors' own practice are given.

Text. The review highlights some of the practical issues of preparation of calibration samples, method of increasing the stability of the sample at the stage of sampling and plasma preparation. In particular, the influence of various anticoagulants on the accuracy of the analysis is reflected. Specify the method of reducing back conversion of some metabolites of carboxyl-containing drugs to parent compound to prevent overestimation of the results of quantitative determination. Some methods of sample preparation, which have become widespread recently, are noted. For example, solid supported liquid-liquid extraction, based on the extraction of the component of interest from the water sample into the liquid layer distributed on a solid high-polar carrier, followed by eluting by a system of non-polar solvents that do not mix with this layer. Recommendations on the use of internal standards, the preparation of the mobile phase for HPLC, on chromatographic separation, validation techniques are given. In the section «Mass spectrometric detection» features of preparation of a mobile phase for chromatography-mass spectrometry experiments are given. The questions of carry-over reduction, ion suppression, matrix effect are covered. The phenomenon of cross-talk in the study of drug metabolism by chromatography-mass spectrometry is discussed. It consists in the mutual distortion of the mass spectrometric response, when the same mass fragments are formed from different ions-precursors. Features of development of techniques for high-performance pharmacokinetic screening are given.

Conclusion. The authors hope that the presented material will be useful for scientists and specialists in the field of pharmacokinetics, biomarker discovery and clinical analyses.

Keywords: liquid chromatography, mass spectrometry, quantification, analytic sample preparation methods, stability.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Miroshnichenko I. I., Shilov Y. E. Analysis of biological samples in a contemporary laboratory practice. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 115–120.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ биологических образцов, или биоанализ – это подраздел аналитической химии, охватывающий количественное определение как экзогенных (например, лекарственные вещества и их метаболиты), так и эндогенных веществ в биологических системах, в частности, в организме человека и экспериментальных животных. Большой пласт этих исследований составляет изучение фармакокинетики (ФК) лекарственных веществ (ЛВ) [1]. В ФК исследованиях применяются разнообразные аналитические методы. Среди них следует упомянуть микробиологические, иммунологические, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и метод флуоресцентного поляризационного иммуноанализа [2], радиоизотопные методы, капиллярный электрофорез [3]. Тем не менее, наиболее распространенным методом остается высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), в частности, с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС-МС), и газовая хроматография (ГХ). Главными достоинствами методов ИФА и ВЭЖХ-МС-МС являются возможность автоматизации (ИФА) и быстрый переход с одного вида анализа на другой при ВЭЖХ-МС-МС. К числу недостатков следует отнести перекрестные реакции в ИФА, ионную супрессию и матричный эффект в ВЭЖХ-МС-МС [4]. Хроматографические подходы позволяют проводить анализ следовых количеств многокомпонентных смесей с достаточной специфичностью и чувствительностью. Поэтому дальнейшее изложение, в основном, ориентировано на хроматографические методы. Проведение иммунологических, радиоизотопных и микробиологических методов, на наш взгляд, является прерогативой специализированных лабораторий. Большое внимание уделяется методу тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС-МС) [5], как одному из наиболее мощных и распространённых инструментов анализа сложных биологических образцов.

Образцы

Приготовление калибровочных образцов начинается с проверки весов и калибровки дозирующих устройств. Если образец стандартной субстанции определяемого ЛВ хранился в холодильнике (особенно при -80°C), перед вскрытием необходимо выдерживать образец в закрытой емкости при комнатной температуре. Это позволит избежать конденсации влаги и погрешности определения массы. Важно учитывать стабильность определяемого вещества при хранении и во время анализа. Так, нифедипин разлагается на свету, поэтому необходимо использовать монохроматический свет красного диапазона длин волн и/или лабораторную посуду из темного стекла при соответствующих манипуляциях. На этапе разработки метода необходимо исследовать стабильность маточных

и рабочих растворов при хранении в холодильнике. Пока их стабильность не доказана, использовать следует свежеприготовленные растворы. Так, например, нейрорепарат оланзапин следует использовать непосредственно после разведения [6]. В общем случае нестабильность молекул обусловлена наличием эфирных связей, гетероатомов серы и фрагментов объектов окислительно-восстановительных реакций.

Матрица

При разработке метода и для построения калибровочных кривых, настоятельно рекомендуется использовать плазму/сыворотку крови того вида животных, на котором планируется проведение основного эксперимента. Если ввиду того или иного обстоятельства используется суррогатная матрица, то в дальнейшем необходимо разбавлять опытные образцы суррогатной сывороткой. Это позволит минимизировать матричный эффект, если, конечно, чувствительность определения высокая. Имеет значение способ получения плазмы. Так, при изучении фармакокинетики парааминосалициловой кислоты использование плазмы с ЭДТА давало большой коэлюирующий пик. Использование гепарина в качестве антикоагулянта решило проблему [7]. В зависимости от природы изучаемого соединения предпринимаются необходимые меры для достижения стабильности образца. Так в плазму, содержащую соединения с карбоксильной группой, добавляется кислота. Таким способом достигается смещение равновесия от образования ацил-глюкуронидов в сторону исходного соединения [8]. К примеру, моксифлоксацин подвергается в организме биотрансформации с образованием двух метаболитов – N-сульфата и ацил-глюкуронида. Без добавления кислоты в исследуемый образец после забора пробы будет протекать обратная реакция превращения ацил-глюкуронида в исходный моксифлоксацин, что будет приводить к завышенным значениям концентрации моксифлоксацина в плазме. Напротив, при измерении содержания ингибиторов протонного насоса лансопразола и омепразола к 0,5 мл плазмы добавляли 25 мкл 1М Na_2CO_3 [9], поскольку препараты разлагаются при кислых значениях pH.

Пробоподготовка

В первом приближении обработка пробы осуществляется путем осаждения белков, жидкость-жидкостной или твердофазной экстракцией [10]. Относительно новым словом в создании готовых решений для пробоподготовки с целью извлечения из биологических матриц ЛВ является жидкость-жидкостная экстракция в нанесенном слое (англ. SLE – Solid supported liquid-liquid extraction). Процедура основана на извлечении интересующего компонента из водного образца в слой жидкости, распределенной на твердом

высокополярном носителе, с последующим элюированием системой неполярных растворителей (например, этилацетат, метил-трет-бутиловый эфир), не смешивающихся с этим слоем [11]. Автоматизированная пробоподготовка включает в себя как жидкость-жидкостную, так и твердофазную экстракцию. В простейшем случае можно ограничиться осаждением сывороточных белков. Роботизированные планшеты с 96 лунками стали достаточно распространенным устройством для обработки проб перед инструментальным анализом. Кроме того, всё большее распространение получают методы очистки образцов *on-line* в ВЭЖХ системе с переключением колонок или с использованием молибдитных колонок.

Разделение

Необходимо иметь в виду, что свойства приготовленных буферных растворов меняются со временем (изменение pH, загрязнение вследствие размножения микроорганизмов), поэтому необходимо указывать на бутылке дату приготовления и следить за истечением срока годности. Величину pH буферного раствора, входящего в состав подвижной фазы, необходимо определять перед добавлением органического модификатора (ацетонитрил, метанол). Растворитель обладает собственным значением pH, что скажется на характеристиках смеси. Более того, исходя из собственного опыта, замечено, что даже переход на ацетонитрил другой фирмы во время одного и того же эксперимента вызывал смещение времени удерживания компонентов. Важно отметить, что для обеспечения высокой эффективности разделения ионных соединений с помощью обращенно-фазовой хроматографии крайне нежелательно использовать значения pH подвижной фазы в непосредственной близости от величины pK_a аналита. При pH подвижной фазы, равной pK_a , концентрации молекулярной и ионной формы аналита в растворе будут равны, что может приводить к уширению и искажению пиков. Кроме того, при этом даже незначительные колебания pH могут приводить к существенному изменению времени удерживания определяемого соединения, и, следовательно, к снижению воспроизводимости анализа.

Важным является также то обстоятельство, что ввод определяемого компонента в растворитель с большей элюирующей силой, чем подвижная фаза приводит к расширению, а нередко и к искривлению, хроматографического пика, что явно нежелательно. Поэтому растворитель образца должен быть максимально сходным по составу с подвижной фазой в начальной точке хроматографического анализа. Прежде не рекомендовалось при градиентном разделении использовать смешение 100% органического растворителя с 100% водным раствором из двух ёмкостей для подвижной фазы, поскольку при этом появляются проблемы нагревания смеси, возникновения пу-

зырьков воздуха. Внедрение в повседневную практику проточных дегазаторов в значительной мере снимает эту проблему. Тем не менее, по возможности, следует использовать 95 или 99% главного компонента. Для обеспечения воспроизводимости анализа не рекомендуется пренебрегать термостатом колонки ВЭЖХ. Температура колонки в высокоэффективной жидкостной хроматографии, конечно, не является решающим параметром, как при газовой хроматографии. Однако, зачастую, можно наблюдать колебания величины времени удерживания аналита, связанные с отсутствием термостатирования.

Внутренний стандарт (IS) – вещество, заведомо не находящееся в исследуемом матриксе. Предназначен для уменьшения влияния факторов системной вариации метода (потери при обработке пробы, различия в степени экстракции, объема введенной пробы, ионизации, эффект матрицы и т.п.). Калибровка отношения сигнала искомого вещества к сигналу IS значительно точнее калибровки по абсолютным значениям отклика (площади, высоты пика) аналита. Необходимо следить за тем, чтобы IS случайным образом не попал в опытные образцы. Кроме того, при ТЛМ не стоит применять в качестве IS лекарственный препарат, используемый для комедикации (к примеру, антидепрессант при измерении концентрации нейрореплетиков). Внутренний стандарт подбирается, по возможности, из соединений, близких по химической структуре к определяемому соединению (изомеров, гомологов, продуктов, получаемых при синтезе). В ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием в качестве внутреннего стандарта лучше всего подходит изотопно-меченное анализируемое вещество. В любом случае, сходная степень экстракции и наличие родственных хроматофоров аналита и IS обязательны. Концентрацию внутреннего стандарта рекомендуют подбирать в диапазоне 30–50% от верхнего предела количественного определения искомого аналита. Хорошей практикой является добавление IS сразу после разморозки проб с последующей обработкой на шейкере для достижения равновесия.

Анализ данных

При изучении клинической фармакокинетики и фармакодинамики правила анализа биологических образцов регулируются контролирующими органами. В ходе валидации метода получают основные параметры в соответствии с правилами FDA (избирательность, чувствительность (предел количественного определения LOQ), правильность, точность, воспроизводимость и стабильность). Помимо этих основных параметров, определяются и другие, например, эффективность экстракции, калибровочный ряд, функции ответа (линейность или нелинейность). Масс-спектрометрия включает в себя оценку таких показателей, как ионная супрессия, матричный эффект и перекрестное взаимодействие (cross-

talk). Валидированный метод позволяет надеяться, что условия анализа будут неизменными во время анализа [12]. Данные, находящиеся вне пределов калибровочного диапазона, не должны включаться в результаты эксперимента. Образцы с высоким содержанием разбавляют соответствующим растворителем или подвижной фазой. Значения ниже LOQ в итоговой таблице классифицируются как ND (not detected). Данные в пределах калибровки округляются в соответствии с величиной LOQ до целых значений, 0,1 или 0,01 соответствующей единицы концентрации. Графики Леви-Дженнинга, где по оси X располагаются инъекции IS (или маркерного соединения), а ось Y отображает площадь пика (иногда высоту пика) позволяют отслеживать точность определения и выявить матричный эффект для некоторых атипичных образцов.

Масс-спектрометрическое детектирование

По той же причине, что и ВЭЖХ все больше вытесняет газовую хроматографию из фармацевтического биоанализа, в гибридных подходах сочетание жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией становится преобладающим методом анализа биологических образцов. Дело в том, что данный подход позволяет анализировать нелетучие и термонеустойчивые вещества, а также обеспечивает высокую специфичность определения. При этом определяемые компоненты сначала разделяют на колонке по времени удерживания, а затем на анализаторе по массам исходного иона и специфического фрагмента. Аналиты переводят в ионы путем электрораспыления (ESI) или химической ионизации при атмосферном давлении (APCI).

Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ-МС имеет свои специфические черты, связанные с детекцией. В ВЭЖХ-МС не используются многие широко распространенные в ВЭЖХ подвижные фазы. В частности, категорически противопоказано использование неорганических буферов. Компоненты фосфатных и других неорганических буферов нелетучие, вследствие этого они накапливаются в ионном источнике и препятствуют ионизации исследуемых соединений. Наиболее распространенными подвижными фазами для ВЭЖХ-МС являются смеси водных растворов летучих солей (формиат аммония, ацетат аммония) или органических кислот (муравьиная кислота, уксусная кислота) с органическими растворителями (ацетонитрил или метанол).

В случае масс-спектрометрии наиболее целесообразно в качестве внутренних стандартов применять аналоги изучаемой молекулы, содержащие стабильные изотопы ^{13}C , ^{15}N или ^2H [13]. Молекулы, отличающиеся только изотопным содержанием (изотопологи), обладают одинаковыми физико-химическими свой-

ствами. Изотопологи легко разделяются по массам в анализаторе, в то же время одинаково реагируют на процессы подготовки пробы, в частности, имеют одинаковую экстракционную способность. Необходимым условием является метка в стабильной части молекулы, не подвергающейся метаболическим превращениям. Также следует учитывать изотопный обмен.

В масс-спектрометрическую методику определения желательнее включить как минимум два MRM-перехода (*multiple reaction monitoring*) с целью исключить влияние матричного эффекта и интерференции, что затруднительно при наличии только одного перехода. Несомненно, широкий линейный калибровочный диапазон, достигаемый в приборах последнего поколения, является большим достижением, поскольку позволяет избежать разбавления образцов. В то же время, не следует забывать о проблеме переноса пробы (*carry-over*). В связи с этим промывка седла и иглы автоинжектора должна быть первоочередной задачей. И это не столь тривиально, как кажется на первый взгляд. Большинство ЛВ являются основаниями и промывочный раствор 50% метанол – 50% вода вряд ли устранил загрязнение. Добавление в воду уксусной или хлорной кислоты способствует снижению переноса пробы.

К сожалению, при использовании ВЭЖХ-МС наблюдается нежелательный феномен ионной супрессии, выражающийся в подавлении хроматографического отклика исследуемого соединения в реальной обработанной биопробе по сравнению с сигналом, полученным при детектировании стандартного образца в чистом растворителе [14]. Возможно, компоненты, содержащиеся в матриксе при ESI, вступают в конкурентную борьбу с молекулами определяемого вещества на поверхности заряженных капель, тем самым снижая степень ионизации последних. Главным преимуществом APCI является незначительная, по сравнению с ESI ионная супрессия. К недостаткам этого метода ионизации следует отнести трудность определения термонеустойчивых веществ.

Для определения матричного эффекта рекомендуют использовать альтернативную матрицу – диализную сыворотку, буферные смеси и вычислять его как отношение площади пика вещества, внесенного в подготовленную матрицу к пику этого вещества в чистом растворителе, выраженное в процентах [15].

$$\text{МЭ (\%)} = \left(\frac{S_{\text{пика аналита в подготовленной матрице}}}{S_{\text{пика аналита в чистом растворителе}}} \right) \cdot 100.$$

Установлено, что такие наполнители как Tween 80 и PEG400, вызывают матричный эффект, зависящий от времени отбора пробы. Это может привести к ошибочному увеличению значений клиренса и объема распределения в несколько раз. Предложен простой способ выявления матричного эффекта: образец в пределах одной партии измеряют обычным способом и при разбавлении соответственно в 5 и 10 раз. Увеличение кон-

центрации аналита при разбавлении свидетельствует о выраженном матричном эффекте [16]. Козлюирующие пики и матричный эффект эксипиентов (вспомогательных веществ лекарственной формы) представляют собой проблему, которую трудно решить на этапе разработки методики, где используется чистая субстанция ЛВ. Метаболиты или интерферирующие пики с тем же самым массовым переходом, что и искомое соединение, могут быть идентифицированы при повторной инъекции образца с достаточно высоким содержанием ЛВ. При изучении ФК это пробы после достижения C_{max} . При этом используют пологий градиент подвижной фазы. При обсуждении методов изучения метаболизма посредством масс-спектрометрии невозможно не коснуться феномена «перекрестных помех» («cross-talk», по терминологии англоязычных авторов) [17]. Взаимное искажение масс-спектрометрического отклика происходит в камере столкновения квадрупольного анализатора, когда от разных по массе ионов-предшественников образуются одинаковые по массе фрагменты. При этом в режиме выбранного иона (SIM, *selected ion monitoring*) ионы от предыдущего мониторинга могут находиться в камере столкновений. Этот эффект зависит от скорости отклика детектора и в современных генерациях приборов в значительной мере преодолен. При изучении метаболизма необходимо принимать во внимание и другой источник перекрестных помех – в источнике ионизации, когда N-окисленные и глюкуронированные метаболиты при ионизации теряют фрагменты 16 и 176 Да, соответственно, что приводит к образованию иона, аналогичного ионизированному исходному веществу

Качество и производительность

На ранних этапах разработки ЛС, при высокопроизводительном фармакокинетическом скрининге (ВПФС) целесообразна разработка экспрессных методик, пусть даже с некоторым ущербом для их валидационных характеристик. Разработка метода зачастую происходит параллельно с получением первичных результатов. Такие показатели, как правильность и воспроизводимость метода, могут быть опущены. В то же время, стабильность образцов и LOQ необходимо установить. ВПФС представляет собой сочетание хроматомасс-спектрометрии и автоматизированных систем пробоподготовки. ВЭЖХ-МС разделение происходит в градиентном режиме на коротких (2–5 см) колонках. Тандемная масс-спектрометрия в этом случае позволяет разделить козлюирующие пики (т. е. пики веществ разной массы, время хроматографического удерживания которых одинаково). Использование коротких колонок позволяет достичь разделения многокомпонентных смесей в течение нескольких минут, что является настоящим прорывом по сравнению с 50-минутными градиентами в обычной ВЭЖХ-практике с применением колонок длиной 25 см. В последнее время были предприняты немалые усилия для

сокращения времени исследования. При проведении ВПФС изучение ФК нового соединения не превышает 5 дней [18]. Для увеличения производительности ВПФС применяются такие подходы как кассетный пул образцов и временной пул [19]. Кассетный пул: несколько ВК, как правило, одного гомологического ряда, вводятся одному животному одновременно (в одном флаконе). Одно из этих веществ должно быть проанализировано заранее при стандартном введении. Образцы, отобранные через разные промежутки времени после введения ВК объединяются в единый пул, который и анализируется. Считается, что подобным методом можно косвенно оценить значение AUC (*area under the curve* – площадь под кривой) для относительной биодоступности. В то же время, проблеме достоверности данных уделяется меньше времени: скрининговый анализ стал чуть ли не синонимом сомнительного анализа. Несмотря на то, что риск в данном случае оправдан (данные должны быть представлены, как можно раньше), возникают вопросы. Нередко значения концентрации, полученные разными лабораториями, различаются между собой. Для принятия обоснованного решения приходится проводить повторный анализ, что приводит к увеличению времени исследования и его удорожанию. Подводя итог, можно заключить, что качество данных не менее важно, чем скорость их получения [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной публикации изложены ключевые моменты основных этапов разработки методик определения следовых количеств лекарственных веществ и метаболитов в биологических жидкостях. Указаны главные источники ошибок. Основное внимание уделено хроматомасс-спектрометрии, которая является базовым методом анализа малых молекул в биологических образцах. Приведены примеры из литературных источников и собственной практики. Авторы выражают надежду, что представленный материал будет полезен для ученых и специалистов в области фармакокинетики, изучения биомаркеров и клинических анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pandey S., Pandey P., Tiwari G., Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*. 2010; 1(1): 14–24. DOI: 10.4103/2229-4708.72223.
2. Glahn-Martínez B., Benito-Peña E., Salis F., Descalzo A. B., Orellana G., Moreno-Bondi M. C. Sensitive rapid fluorescence polarization immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem.* 2018; 90(8): 5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
3. Li J., Zhang L., Cheng X., Zhang L., Shen B., Qing C., Fan G. Determination of d-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma by a 96-well formatted liquid-liquid extraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 156: 263–271. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.040.

4. Brandhorst G., Oellerich M., Maine G., Taylor P., Veen G., Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin. Chem.* 2012; 58 (5): 821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
5. Aubry A.F. LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*. 2011; 3 (16): 1819–1825. DOI: 10.4155/bio.11.166.
6. Karinen R., Øiestad E. L., Andresen W., Smith-Kiell A., Christophersen A. Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J. Anal. Toxicol.* 2011; 35(8): 583–590.
7. Мирошниченко И. И., Соколова Г. Б., Мохирева Л. В. Клиническая фармакокинетика таблеток парааминосалициловой кислоты. *Антибиотики и химиотерапия*. 2009; 54(1–2): 20–24.
8. Zhou J., Li F., Duggan J. X. LC–MS bioanalysis of acyl glucuronides. In: Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. (Eds). *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, NJ, USA. 2013; 447–460 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118671276.ch35>.
9. Мирошниченко И. И., Юрченко Н. И. Определение содержания омепразола и лансопризола в плазме крови методом ВЭЖХ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2002; 36(7): 48–49.
10. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(9): 1123–1140. DOI: 10.4155/bio.12.73.
11. Musteata F. M. Extraction and microextraction in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(19): 2321–2323. DOI: 10.4155/bio.12.206.
12. Sonawane L. V., Poul B. N., Usnale S. V., Waghmare P. V., Surwase L. H. Bioanalytical method validation and its pharmaceutical application – a review. *Pharm. Anal. Acta*. 2014; 5(3): 288–295.
13. Schellekens R. C., Stellaard F., Woerdenbag H. J., Frijlink H. W., Kosterink J. G. Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011; 72(6): 879–897. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04071.x.
14. George R., Haywood A., Khan S., Radovanovic M., Simmonds J., Norris R. Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Ther. Drug. Monit.* 2018; 40(1): 1–8. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000471.
15. Zhou W., Yang S., Wang P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. 2017; 9(23): 1839–1844. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.
16. Larger P. J., Breda M., Fraier D., Hughes H., James C. A. Ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 39(1–2): 206–216. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.009.
17. Sotgia S., Murphy R. B., Zinellu A., Elliot D., Paliogiannis P., Pinna G. A., Carru C., Mangoni A. A. Development of an LC-tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of hercynine in human whole blood. *Molecules*. 2018; 23(12): E3326. DOI: 10.3390/molecules23123326.
18. Bateman K. P., Cohen L., Emary B., Pucci V. Standardized workflows for increasing efficiency and productivity in discovery stage bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013; 5(14): 1783–1794. DOI: 10.4155/bio.13.162.
19. Swales J. G., Tucker J. W., Strittmatter N., Nilsson A., Cobice D., Clench M. R., Mackay C. L., Andren P. E., Takáts Z., Webborn P. J., Goodwin R. J. Mass spectrometry imaging of cassette-dosed drugs for higher throughput pharmacokinetic and biodistribution analysis. *Anal. Chem.* 2014; 86(16): 8473–8080. DOI: 10.1021/ac502217r.
20. Ho S. Best practices for discovery bioanalysis: balancing data quality and productivity. *Bioanalysis*. 2014; 6(20): 2705–2708. DOI: 10.4155/bio.14.201.
- immunoassay for free mycophenolic acid determination in human serum and plasma. *Anal. Chem.* 2018; 90(8): 5459–5465. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00780.
3. Li J., Zhang L., Cheng X., Zhang L., Shen B., Qing C., Fan G. Determination of d-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma by a 96-well formatted liquid-liquid extraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018; 156: 263–271. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.040.
4. Brandhorst G., Oellerich M., Maine G., Taylor P., Veen G., Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin. Chem.* 2012; 58(5): 821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
5. Aubry A. F. LC-MS/MS bioanalytical challenge: ultra-high sensitivity assays. *Bioanalysis*. 2011; 3(16): 1819–1825. DOI: 10.4155/bio.11.166.
6. Karinen R., Øiestad E. L., Andresen W., Smith-Kiell A., Christophersen A. Comparison of the stability of stock solutions of drugs of abuse and other drugs stored in a freezer, refrigerator, and at ambient temperature for up to one year. *J. Anal. Toxicol.* 2011; 35(8): 583–590.
7. Miroshnichenko I. I., Sokolova G. B., Mokhireva L. V. Clinical pharmacokinetics of para-aminosalicylic acid tablets. *Antibiot. Khimioter.* 2009; 54(1–2): 20–24 (in Russ.).
8. Zhou J., Li F., Duggan J. X. LC–MS bioanalysis of acyl glucuronides. In: Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. Li W., Zhang J., Tse F.L.S. (Eds). *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, NJ, USA. 2013; 447–460. <https://doi.org/10.1002/9781118671276.ch35>.
9. Miroshnichenko I. I., Yurchenko N. I. HPLC Analysis for omeprazole and lansoprazole in blood plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2002; 36(7): 389–391 (in Russ.).
10. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(9): 1123–1140. DOI: 10.4155/bio.12.73.
11. Musteata F. M. Extraction and microextraction in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2012; 4(19): 2321–2323. DOI: 10.4155/bio.12.206.
12. Sonawane L. V., Poul B. N., Usnale S. V., Waghmare P. V., Surwase L. H. Bioanalytical method validation and its pharmaceutical application – a review. *Pharm. Anal. Acta*. 2014; 5(3): 288–295.
13. Schellekens R. C., Stellaard F., Woerdenbag H. J., Frijlink H. W., Kosterink J. G. Applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011; 72(6): 879–897. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04071.x.
14. George R., Haywood A., Khan S., Radovanovic M., Simmonds J., Norris R. Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Ther. Drug. Monit.* 2018; 40(1): 1–8. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000471.
15. Zhou W., Yang S., Wang P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*. 2017; 9(23): 1839–1844. DOI: 10.4155/bio-2017-0214.
16. Larger P. J., Breda M., Fraier D., Hughes H., James C. A. Ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 39(1–2): 206–216. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.03.009.
17. Sotgia S., Murphy R. B., Zinellu A., Elliot D., Paliogiannis P., Pinna G. A., Carru C., Mangoni A. A. Development of an LC-tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of hercynine in human whole blood. *Molecules*. 2018; 23(12): E3326. DOI: 10.3390/molecules23123326.
18. Bateman K. P., Cohen L., Emary B., Pucci V. Standardized workflows for increasing efficiency and productivity in discovery stage bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013; 5(14): 1783–1794. DOI: 10.4155/bio.13.162.
19. Swales J. G., Tucker J. W., Strittmatter N., Nilsson A., Cobice D., Clench M. R., Mackay C. L., Andren P. E., Takáts Z., Webborn P. J., Goodwin R. J. Mass spectrometry imaging of cassette-dosed drugs for higher throughput pharmacokinetic and biodistribution analysis. *Anal. Chem.* 2014; 86(16): 8473–8080. DOI: 10.1021/ac502217r.
20. Ho S. Best practices for discovery bioanalysis: balancing data quality and productivity. *Bioanalysis*. 2014; 6(20): 2705–2708. DOI: 10.4155/bio.14.201.

REFERENCES

1. Pandey S., Pandey P., Tiwari G., Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*. 2010; 1(1): 14–24. DOI: 10.4103/2229-4708.72223.
2. Glahn-Martínez B., Benito-Peña E., Salis F., Descalzo A. B., Orellana G., Moreno-Bondi M. C. Sensitive rapid fluorescence polarization



МАРКИРОВКА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

24 МАЯ 2019 | ГОСТИНИЦА МЕТРОПОЛЬ,
ЗАЛ «ЧЕХОВ», ТЕАТРАЛЬНЫЙ ПРОЕЗД, ДОМ 2

ВОПРОСЫ К ОБСУЖДЕНИЮ:

- + Готовность нормативной базы и участников рынка к обязательной маркировки. Реальные сроки для розницы
- + Концепция создания и функционирования системы маркировки и прослеживаемости движения товаров. Технические параметры проекта. Что изменилось по сравнению с пилотным проектом?
- + Какие итоги показал эксперимент по маркировке и как они будут учтены начиная с 2020 года?
- + Оборудование для маркировки. Разработка технических средств. Что нужно знать производителям о внедрении оборудования?
- + Замена оборудования и настройки товарных программ. Какие риски кроются для аптечных сетей?
- + Как отразятся нововведения на стоимости лекарственных средств?



По вопросам делегатского участия:
Юлия Лючина
+7(923)675-41-71
info@sobytie.msk.ru



Подробнее:
<http://sobytie.msk.ru/pharma2019>



DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130
УДК 543.544; 615.074

Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике

Н. А. Эпштейн^{1*}

1 – Центр регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, д. 13А

*Контактное лицо: Эпштейн Наум Аронович. E-mail: naumepshtein@gmail.com

ORCID ID: orcid.org/0000-0001-8047-4078. Researcher ID: A-7114-2019

Статья получена: 16.04.2019. Статья принята к печати: 18.04.2019

Резюме

Введение. При валидации аналитических методик одной из обязательных характеристик является «Линейность». Вопросы, связанные с валидацией линейности методик, до сих пор являются актуальными.

Цель. Рассмотреть основные графические и расчетные критерии для подтверждения линейности аналитических методик и их ограничения, а также дать рекомендации.

Материалы и методы. Статистические расчеты выполнены с помощью программы MS Excel. Экспериментальные данные получены методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Подробно рассмотрены основные критерии для доказательства/подтверждения линейности аналитических методик и их ограничения. Показано, что эти критерии не всегда могут дать надежную оценку линейности методики, указаны возможные причины этого и даны рекомендации.

Заключение. При валидации методик необходимо доказывать/подтверждать их линейность с помощью двух, а надежнее – трех критериев, одним из которых обязательно должна быть линейность графика зависимости измеряемого отклика (Y) от концентрации определяемого вещества (C). С другой стороны, показано, что не следует формально подходить к оценке нелинейности методики при использовании графических и расчетных критериев, основанных на математической статистике, так как они не учитывают возможность практической незначимости небольших отклонений от линейной зависимости Y от C.

Ключевые слова: валидация, линейность, методики, критерии приемлемости.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(2): 122–130.

Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice

N. A. Epshtein^{1*}

1 – Center of registration and development of medicines LLC «IRVIN 2», 13A, Kolomensky passage, Moscow, 115446, Russia

*Corresponding author: Naum A. Epshtein. E-mail: naumepshtein@gmail.com

ORCID ID: orcid.org/0000-0001-8047-4078. Researcher ID: A-7114-2019

Received: 16.04.2019. Accepted: 18.04.2019

Abstract

Introduction. «Linearity» is one of the required characteristics when validating analytical procedures. The issues of the validation of linearity procedures are still relevant.

Aim. To consider the main graphical and calculated criteria for confirmation of the linearity of analytical procedures and their restrictions, as well as to give recommendations.

Materials and methods. Statistical calculations were performed using MS Excel. Experimental data were obtained by HPLC.

Results and discussion. The main criteria for proving/confirming the linearity of analytical procedures and their restrictions are considered in detail. It is shown that these criteria cannot always give a reliable assessment of the linearity of the procedure, the possible reasons for this are indicated and recommendations are given.

Conclusion. When validating the procedures, it is necessary to prove/confirm their linearity by using two, and, more reliably, three criteria, one of which must be the linearity of the plot of measured response (Y) vs concentration of the tested substance (C). On the other hand, we demonstrate here that a formal approach should not be used for the estimation of non-linearity of the procedure when using graphical and calculation criteria based on mathematical statistics, since they do not take into account the possibility of practical insignificance of small deviations from the linear dependence of Y on C.

Keywords: validation, linearity, procedures, acceptance criteria.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Epshtein N. A. Validation of analytical procedures: graphic and calculated criteria for assessment of methods linearity in practice. *Drug development & registration*. 2019; 8(2): 122–130.

ВВЕДЕНИЕ

При валидации аналитических методик одной из обязательных характеристик является «Линейность» [1–8]. Согласно ICH «Линейность аналитической методики – это ее способность (в пределах заданного диапазона) получать результаты прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце» [1]. Цель валидации линейности методик, согласно фармакопее США, «состоит в том, чтобы иметь модель, линейную или нелинейную, которая близко (<точно>) описывает взаимосвязь концентрация – отклик» (под откликом понимается измеряемый сигнал или результат его обработки); «если линейность недостижима, можно использовать нелинейную модель» [2]. То есть речь идет о желательности, но не обязательности подтверждения линейной модели взаимосвязи концентрация – отклик при валидации методик. Подчеркнем, что *фактически суть теста «Линейность» заключается в проверке (до подтверждения правильности и прецизионности методики) возможности использования линейной модели как наиболее простой и предпочтительной на практике. В то же время по результатам теста «Линейность» может быть показана необходимость использования нелинейной модели, если нелинейная модель более близко (точно), чем линейная, описывает взаимосвязь концентрация – отклик и будет подтверждена правильность и прецизионность методики.*

Линейность методик подтверждают чаще всего в соответствии с ICH [1]: визуально графиком зависимости измеряемого отклика Y (например, площади пика в ВЭЖХ) от концентрации C определяемого вещества и приемлемым значением коэффициента корреляции R линейной регрессионной зависимости Y от C ; приводят регрессионное уравнение или статистические характеристики регрессии. На практике применяют и другие критерии для оценки линейности/нелинейности зависимости Y от C , основанные на математической статистике [6–24], и для этого есть определенные причины, как будет видно из текста статьи. Неудивительно поэтому, что до сих пор остаются актуальными вопросы, связанные с критериями линейности аналитических методик как при практической валидации методик, так и при экспертизе валидационной документации.

Цель статьи: рассмотреть основные графические и расчетные критерии для подтверждения линейности аналитических методик и их ограничения, а также дать рекомендации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистические расчеты, представленные в статье, выполнены с помощью программы MS Excel, в том числе с помощью статистического пакета, входящего в ее состав. Экспериментальные данные, приведен-

ные в качестве примеров, получены методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Waters e2695 с детектором Waters 2998 Photodiode Array Detector.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего обсудим почему важна именно линейность методики, ведь известно, что для калибровочного графика можно использовать нелинейную модель зависимости Y от C [6, 11–22]. Это можно объяснить следующими причинами. Во-первых, возможностью использования наиболее простого метода – абсолютной калибровки (одной концентрации раствора стандарта) при «пренебрежимой постоянной систематической ошибке (величине отрезка, отсекаемого осью ординат)» [6, с. 102]; во-вторых, при рутинном анализе в случае линейного калибровочного графика достаточно использовать 2-3 точки в то время как при нелинейном калибровочном графике потребуется не менее 5 точек, а это большие затраты времени особенно в случае сравнительно медленных хроматографических методик анализа.

Необходимое количество экспериментальных точек и растворов, используемые для валидации линейности. Для валидации линейности методики в руководстве по валидации ICH рекомендуется использовать не менее 5 экспериментальных точек – концентраций определяемого вещества [1], что согласуется с рекомендацией из математической статистики [25, с. 190]. В то же время пяти точек может оказаться недостаточно для надежного вывода о линейности/нелинейности методики [6]. Для валидации линейности методики ICH допускает получение растворов необходимых концентраций путем разведения раствора стандарта. При этом игнорируется возможность влияния вспомогательных веществ, так как оно косвенно проверяется тестом «Правильность». В то же время, согласно ICH, для подтверждения линейности методики вместо разведения раствора стандарта можно использовать результаты, получаемые на смесях определяемого вещества с плацебо – при тестировании правильности методики. Это обычно сокращает объем работ и существенно повышает надежность выводов о линейности/нелинейности методики, так как учитывается влияние плацебо и увеличивается количество экспериментальных точек – не менее 9, распределенных по возможности равномерно в аналитическом диапазоне методики. На практике мы используем именно такой подход для методик определения содержания основных веществ.

Диапазон (аналитическая область) методики, для которого необходимо валидировать линейность, зависит от типа методики [1, 6]:

- Для методик количественного определения основных веществ в фармацевтических субстанциях и лекарственных формах: «не менее, чем от 80 до 120% от номинального содержания» (то есть кон-

центрация испытуемых растворов должна охватывать диапазон, соответствующий не менее 80,0–120,0% от номинального содержания определяемого вещества).

- Для методик определения однородности дозирования: «не менее, чем от 70 до 130% от номинального содержания, если для испытания не требуется более широкий интервал (например, для аэрозолей)».
- Для методик испытаний на растворение: « $\pm 20\%$ (абсолютных) по отношению к верхней / нижней границам указанного в спецификации диапазона».
- Для методик определения примесей: «от порога игнорирования примесей (порога регистрации) [26] или предела количественного определения (LOQ) до не менее, чем 120% от нормируемого предела». В фармакопее США иное требование: «от 50% до не менее, чем 120% от нормируемого предела» [2].

Рассмотрим основные критерии для оценки линейности зависимости Y от C , применяемые при валидации аналитических методик и их ограничения.

Коэффициент корреляции R

При валидации аналитических методик для подтверждения их линейности чаще всего используют коэффициент корреляции Пирсона R и график зависимости измеряемого отклика Y от концентрации C определяемого вещества [1–6]. При этом в качестве критерия приемлемости для коэффициента корреляции R можно ориентироваться на $R \geq 0,999$ – для методик определения содержания основных веществ [5, 27] и $R \geq 0,98$ – для методик определения содержания примесей [4]. Встречаются и другие критерии приемлемости, например, для методик определения содержания основных веществ $R > 0,998$ для АФИ и $R > 0,990$ для препаратов [28], $R \geq 0,995$ [29]. Наиболее низкие допустимые (критические) значения R , принимая во внимание возможность округления чисел, указаны в ГФ XIV: «в большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $R \geq 0,99$, и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости, для которых $R \geq 0,9$ » [3]; по нашему опыту столь низкие допустимые значения R следует рассматривать как недостаточно надежные, приемлемые только при подтверждении правильности и прецизионности методики.

Приведенные выше допустимые значения R для определения содержания основных веществ существенно больше, чем критические значения коэффициента корреляции Пирсона $R_{crit'}$ используемые для теоретической оценки наличия линейной связи между Y и C . Например, для $n=5$ точек экспериментальных данных для одностороннего теста при вероятности $P=95,0\%$ $R_{crit}=0,805$, при $P=99,0\%$ $R_{crit}=0,934$, а при увеличении количества точек значение R_{crit} только уменьшается (<http://www.magniel.com/alex/spearman.html>). Это указывает на эмпирический характер упомяну-

тых выше рекомендаций по значениям R и может быть объяснено тем, что коэффициент корреляции Пирсона основывается на линейной модели взаимосвязи Y – C и, более того, характеризует лишь корреляционную связь Y и C без учета ее практической значимости [11, 12].

График остатков

В общем случае зависимость измеряемого отклика Y от C на самом деле может оказаться нелинейной даже при высоком значении коэффициента корреляции; характерный пример с $R=0,99952$ приведен в [4]. Поэтому в руководстве по валидации аналитических методик ИСН рекомендуется использовать *дополнительный критерий линейности – график остатков* [1]. Как правило, он представляет собой графическую зависимость разности экспериментального и вычисленного по уравнению регрессии значения отклика ($Y_{exp} - Y_{cal}$) от концентрации C . Иногда вместо C используют Y_{cal} [9]. В качестве критерия приемлемости рассматривается отсутствие нелинейной тенденции в расположении точек на графике остатков: «график остатков должен демонстрировать случайный характер остатков в постоянном диапазоне при отсутствии какой-либо последовательности или закономерности» [6]. При УФ-детектировании рекомендуется использовать не более, чем 10-кратный диапазон концентраций [6], иначе рискуют столкнуться с нелинейной зависимостью Y от C .

Если пяти экспериментальных точек недостаточно для однозначного вывода о линейности или нелинейности зависимости Y от C по графику остатков, то следует увеличить количество экспериментальных точек или, что надежнее, для тестирования линейности методики использовать значения Y полученные в тесте «Правильность». С другой стороны, линейность методики – это понятие в значительной степени условное, о чем говорит многообразие критериев для оценки линейности при валидации методик. В связи с этим не следует формально подходить к оценке линейности/нелинейности методики при использовании критериев, основанных на математической статистике, в том числе графика остатков. Если как на рисунке 1, график остатков указывает на нелинейность методики с теоретической точки зрения, однако, на практике все экспериментальные точки располагаются на линии регрессии или близко к ней, а также очевидно (рисунок 1) или подтверждено расчетом, что нелинейная модель не будет более точно, чем линейная, описывать зависимость Y от C , то логично сделать вывод: методика линейная и подтвердить/проверить это результатами тестирования правильности и прецизионности методики.

Примечание. Условием для получения корректных графика остатков и обычной (невзвешенной) линейной регрессии является постоянство стандарт-

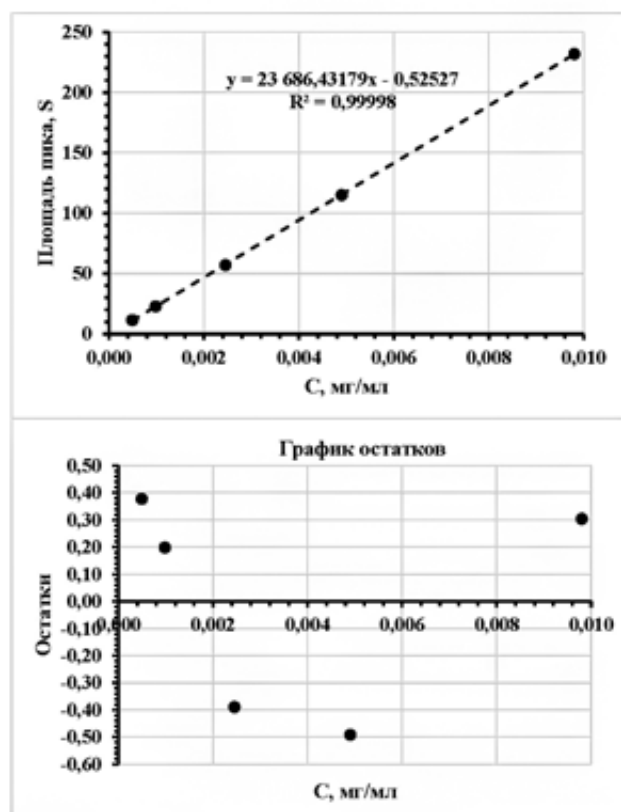


Рисунок 1. Результаты определения зависимости площади пика (S) примеси от ее концентрации (C) – сверху, и соответствующий ему график остатков – внизу, который формально указывает на нелинейную тенденцию, однако, этой тенденцией можно пренебречь с практической точки зрения (см. текст)

Figure 1. The results of determining the dependence of the peak area (S) of the impurity on its concentration (C) – above, and below the corresponding plot of the residuals that formally indicates a non-linear trend. However, this trend can be ignored from a practical perspective (see text)

ного отклонения остатков. Непостоянство стандартного отклонения остатков – гетероскедастичность, можно визуальное распознать по клиновидной форме распределения остатков или путем сравнения разброса результатов параллельных измерений в зависимости от концентрации, а также методами математической статистики [6]. При выявлении гетероскедастичности для получения адекватной модели регрессии следует увеличить вклад/весомость меньших концентраций с помощью весовых коэффициентов (взвешенная линейная регрессия) [6].

График зависимости Y/C от C

Для оценки линейности методики вместо графика остатков иногда используют график зависимости Y/C от C, называемый «графиком чувствительности» [6]. В соответствии с формулой $Y=bC+a$ можно ожидать, что на графике зависимости Y/C от C в случае линейности методики точки будут располагаться вблизи линии тренда $\approx b$, характеризующей чувствительность мето-

дики и почти параллельной оси концентраций. Однако следует учитывать, что необходимым условием для оценки линейности методики по графику зависимости Y/C от C является близость к нулю свободного члена регрессии a , так как $Y/C=b+a/C \approx b$ только при $a \approx 0$. Поэтому перед построением графика зависимости Y/C от C надо убедиться, что свободный член регрессионного уравнения a статистически незначим. Для этого можно использовать t -критерий Стьюдента. Значение a статистически незначимо ($a \approx 0$), если [30, с. 177]:

$$t_a = \frac{|a|}{SD_a} < t(P, f = n - 2), \quad (1)$$

где t_a – расчетное значение критерия Стьюдента; $|a|$ – абсолютное значение свободного члена линейной зависимости Y от C; SD_a – стандартное отклонение значения a ; $t(P, f=n-2)$ – табличное значение t -критерия Стьюдента при вероятности $P=95\%$; f – число степеней свободы; n – количество экспериментальных точек на регрессионной прямой.

Критерии дисперсионного анализа (ANOVA): F-критерии и p-значение

Для проверки линейности методики иногда применяют дисперсионный анализ (ANOVA) вместе с визуальным подтверждением линейности зависимости Y от C. Основными являются два варианта ANOVA.

- **LOF-тест** («Lack of fit test») – тест со статистическим обчетом результатов параллельных измерений. Его потенциальным преимуществом является независимость критерия приемлемости от принятой модели взаимосвязи Y и C. В этом варианте для каждой концентрации проводится несколько повторных измерений, например, по 3 инъекции в случае методики ВЭЖХ [10]. При этом рекомендуется брать не менее 8 концентраций в предполагаемом диапазоне действия методики [6].

В основе LOF-теста лежит рассмотрение определенных остатков (Residuals) и их квадратов, от которых зависит вариабельность полной ошибки измерения [6, 9, 24]:

$$Residual = y_{ij} - \hat{y}_i = Pure\ error + LOF\ error, \quad (2)$$

$$Pure\ error = y_{i,j} - \bar{y}_i; \quad LOF\ error = \bar{y}_i - \hat{y}_i, \quad (3)$$

где y_{ij} – результат j -го измерения в точке i (т. е. при концентрации C_i); \bar{y}_i – среднее значение измерения и \hat{y}_i – значение y , вычисленное по уравнению регрессии, в точке i . Из (3) видно, что *Residual* (остаток) представляет собой отклонение измеряемой величины y_{ij} от предсказываемой \hat{y}_i по уравнению регрессии в точке i . *Residual* является суммой **Pure error (PE)** – случайной, «чистой ошибки», которая не зависит от принятой

регрессионной модели и представляет собой разность между результатом параллельного определения y_{ij} и средним значением параллельных определений \bar{y}_i в точке i , и **LOF** – «ошибки неадекватности подбора (lack of fit error)» [6], представляющей собой разность между результатом параллельного определения y_{ij} и расчетным значением \hat{y}_i по уравнению регрессии в точке i .

Вариабельность полной ошибки измерения SS_T можно представить в виде суммы квадратов для чистой ошибки (SS_{PE}), **LOF** (SS_{LOF}) и фактора, связанного с регрессионной моделью (SS_{REG}) [9]:

$$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{m_i} (y_{i,j} - \bar{y})^2 =$$

$$\underbrace{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{m_i} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}_{SS_{PE}} + \underbrace{\sum_{i=1}^k m_i \cdot (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}_{SS_{LOF}} + \underbrace{\sum_{i=1}^k m_i \cdot (\hat{y}_i - \bar{y})^2}_{SS_{REG}}, \quad (4)$$

где k – количество концентраций; m_i – число параллельных определений при i -ой концентрации.

Из (4) при рассмотрении остатков SS_{RES} следует, что SS_{LOF} зависит от принятой регрессионной модели, так как зависит от \hat{y}_i и поэтому может быть использовано для оценки линейности методики. Условием для подтверждения линейности методики является выполнение требования к экспериментальному значению F -критерия [6, 9]:

$$F_{exp} = \frac{SS_{LOF}/(k-2)}{SS_{PE}/(n-k)} \leq F(P, f_1, f_2) = F(P, k-2, n-k), \quad (5)$$

где k – количество концентраций; n – общее число измерений ($n = m \cdot k$ при количестве параллельных измерений $m_i = m$); $F(P, f_1, f_2)$ – критическое (табличное) значение F -критерия Фишера для вероятности P (обычно 95%) и степеней свободы $f_1 = k - 2$ и $f_2 = n - k$. Формула (5) является критерием Фишера, так как рассматривается отношение двух дисперсий: $SS_{PE}/(n-k)$ – расчетная оценка дисперсии σ^2 , $SS_{LOF}/(k-2)$ – расчетная оценка $\sigma^2 + bias^2$ (где $bias$ – смещение из-за «неадекватности подбора»), если используется неадекватная модель.

Отметим, что этот метод, как и другие варианты ANOVA, иногда может приводить к ошибочному выводу о нелинейности методики [10], и поэтому в случае $F_{exp} >$ критического значения F следует посмотреть на график остатков, как это рекомендовано в [9]. Так в [10] при использовании метода ВЭЖХ было установлено, что в то время как график остатков указывал на линейную зависимость Y от x , **LOF**-тест показал, что $F_{exp} > F(P, k-2, n-k)$ и, как оказалось, это было обусловлено дополнительным источником вариации Y , связанным с

пробоподготовкой. Это обосновали теоретически и ввели иной экспериментальный F -критерий (**модифицированный LOF-тест** 10)), который подтвердил линейную зависимость Y от x .

Мы тоже наблюдали ситуацию, сходную с [10], когда при очевидной линейной зависимости площади пика (S) от концентрации и отсутствии нелинейной тенденции на графике остатков (рисунок 2) оказалось, что $F_{exp} = 25,2455 > F(95\%, 8, 20) = 2,4471$, то есть **LOF**-тест ошибочно не подтвердил линейную зависимость S от C . Так как при этом была очень высокая сходимость результатов параллельных определений площади пика АФИ (значения относительного стандартного отклонения RSD находились в диапазоне от 0,04 до 0,22%), было сделано предположение о том, что именно низкие значения RSD делают определяющим вклад дополнительного источника вариации S и приводят к ошибочному выводу **LOF**-теста. Для проверки этого предположения в таблице Excel увеличили разброс результатов параллельных определений по сравнению с экспериментальными данными: RSD от 0,54 до 1,03%. В результате увеличения RSD значение F_{exp} уменьшилось до $F_{exp} = 1,5331 < F(95\%, 8, 20) = 2,4471$ и **LOF**-тест подтвердил линейную зависимость Y от C как и ожидалось. При этом лишь незначительно изменились параметры регрессионной зависимости Y от C и график остатков (рисунок 2). Из полученных результатов следует, что при высокой воспроизводимости результатов измерений – RSD меньше $\approx 0,5\%$ в нашем случае, немодифицированный **LOF**-тест может приводить к ошибочному выводу о нелинейности аналитической методики. Наоборот, иногда при плохой воспроизводимости результатов параллельных определений можно получить $F_{exp} \leq F(P, f_1, f_2)$ и при этом методика может обладать необходимой прецизионностью [24, р. 103].

• **«F/p-тест» линейной зависимости** – тест без статистического обобщения результатов параллельных измерений. В качестве исходных данных используют значения Y экспериментальные (Y_{exp}) и рассчитанные по линейному уравнению регрессии (Y_{cal}). Теоретическая основа этой процедуры подробно рассмотрена в Internet: <https://excel2.ru/articles/proverka-znachimosti-regressii-s-pomoshchyu-dispersionnogo-analiza-f-test> с примером в Excel https://excel2.ru/sites/default/files/node/808/edit/_f-test_for_simple_regression.xlsx.

Для подтверждения линейности зависимости Y от C требуется, чтобы расчетная величина значения F -критерия (F_o), получаемая с помощью функции =ЛИНЕЙН(диапазон Y ; диапазон X ; ИСТИНА; ИСТИНА):

$$F_o = \frac{SSR/1}{SSE/(k-2)}, \quad (6)$$

где

$$SSR = \sum_{i=1}^k (\hat{y}_i - \bar{y})^2; SSE = \sum_{i=1}^k (y_i - \hat{y}_i)^2, \quad (7)$$

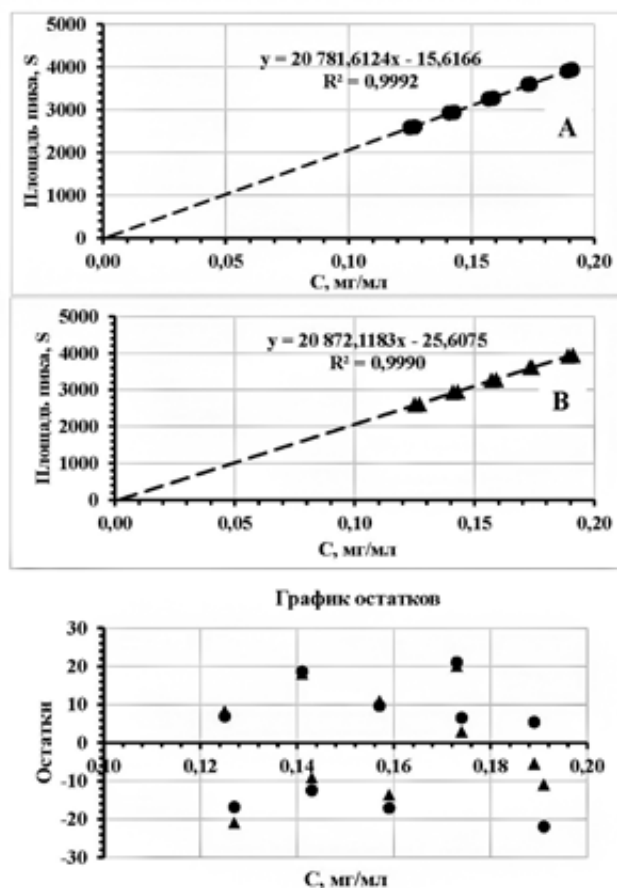


Рисунок 2. Экспериментальные (А) и скорректированные (В) – путем увеличения относительного стандартного отклонения (RSD) параллельных измерений, результаты определения зависимости площади пика (S) АФИ от концентрации (C). В случае (А) из-за очень высокой воспроизводимости параллельных измерений (RSD от 0,04 до 0,22%) LOF-тест не подтвердил линейность, хотя точки на графике остатков (●) указывали на линейность методики. При увеличении RSD параллельных измерений до 0,54–1,03% – случай (В), имело место лишь незначительное изменение параметров регрессионной зависимости Y от C и графика остатков (▲) по сравнению с (А), однако, этого оказалось достаточно, чтобы LOF-тест подтвердил линейность методики (пояснения см. в тексте).

Figure 2. Experimental (A) and corrected by increasing the relative standard deviation (RSD) parallel measurements – (B) results of determining the dependence of the peak area (S) of the API on its concentration. In case (A), due to the very high reproducibility of parallel measurements (RSD, 0.04 to 0.22%) the LOF test did not confirm linearity, although the points on the plot of the residuals (●) pointed to the linearity of the procedure. When increasing RSD of parallel measurements up to 0.54–1.03% – case (B), there was only a slight change in the parameters of the regression dependence of Y against C and of the plot of the residuals (▲) compared to (A). However, this turned out to be sufficient so that the LOF test to confirm the linearity of the method (see text for explanation).

была больше критического значения критерия Фишера F_{crit} (вычисляемого с использованием функции $=F.ОБР.ПХ(\alpha, 1, k - 2)$, где k – количество экспериментальных данных – точек на графике, a – расчетное значение критерия p (вычисляемого с использованием функции $=F.ПАСП.ПХ(F_{crit}; 1; k - 2)$ было бы меньше заданного уровня значимости α (обычно $\alpha=0,05$ или $\alpha=0,01$,

что соответствует вероятности 95% или 99% соответственно)¹. Отметим, что SSR соответствует SS_{REG} в (4), а SSE соответствует SS_{LOF} при $m_i=1$ и $i=1$. Использование этого варианта ANOVA обычно не вызывает затруднений, однако, он основан на линейной модели, а это снижает надежность его выводов. Например, для регрессионной зависимости Y от C на рисунке 1, в отличие от графика остатков (нелинейность), результаты этого теста, полученные в Excel, указали на отсутствие нелинейности:

ANOVA – оценка линейности			
	F-критерий	p	
F_o	1,45956E+05		
$\alpha=$	0,5		
$=F.ОБР.ПХ(\alpha, 1, k - 2)$	10,12796	3,95484E-08	$=F.ПАСП.ПХ(F_o; 1; k - 2)$
Линейность	ИСТИНА	ИСТИНА	

Остаточное стандартное отклонение SD_o и индекс корреляции R_c

На Украине разработан альтернативный ICH подход для валидации линейности методик [8], основанный на использовании нормализованных координат и предельно допустимой неопределенности методики анализа [7, 8]. При валидации линейности методик в качестве контролируемых характеристик рассматривают остаточное стандартное отклонение SD_o и индекс корреляции R_c . Условием для применимости SD_o и подхода в целом, является статистическая/практическая незначимость свободного члена регрессионной зависимости a (то есть $a \approx 0$). Используют следующий алгоритм:

Методом наименьших квадратов рассчитывают линейную регрессионную зависимость между нормализованными экспериментальными значениями отклика Y_n и концентрации C_n :

$$Y_{ni} = bC_{ni} + a, \quad (8)$$

где $Y_{ni} = Y_i / Y_{st}$, $C_{ni} = C_i / C_{st}$, индексы i и st относятся соответственно к i -му испытуемому раствору и к стандартному раствору, индекс n указывает на то, что рассматриваются нормализованные значения. Затем проверяют статистическую/практическую незначимость свободного члена регрессионного уравнения (8). После подтверждения того, что $a \approx 0$, проверяют выполнение требования к остаточному стандартному отклонению SD_o по формуле:

$$SD_o / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n - 2)}, \quad (9)$$

¹Англоязычный эквивалент $F.ОБР.ПХ(\alpha, 1, k - 2)$ это $F.INV.RT(\alpha, 1, k - 2)$, а $F.ПАСП.ПХ(F_{crit}; 1; k - 2)$ это $F.DIST.RT(F_{crit}; 1; k - 2)$.

в которой SD_0 – остаточное стандартное отклонение, которое можно определить в Excel с помощью функции =СТОШУХ(диапазон Y; диапазон X); Δ_{As} – предельно допустимая неопределенность методики анализа, вычисляемая по простым формулам [7, 8]; $t(95\%, n-2)$ – значение одностороннего t -критерия Стьюдента для вероятности 95% и числа степеней свободы $n-2$; n – объем выборки (число экспериментальных точек на графике)¹.

При выполнении условия (9) вычисляют индекс корреляции по формуле:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{SD_0^2}{RSD_{Range}^2}}, \quad (10)$$

в которой SD_0 – остаточное стандартное отклонение, а RSD_{Range} – стандартное отклонение концентраций, вычисляемое по формуле:

$$RSD_{Range} = \sqrt{\sum \frac{(C_{ni} - \bar{C}_n)^2}{(n-1)}} \cdot 100\%, \quad (11)$$

где C_{ni} и \bar{C}_n – соответственно концентрация i -го раствора и средняя концентрация растворов в нормализованных координатах, n – число экспериментальных точек. Затем проверяют выполнение требования к индексу корреляции:

$$R_c \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As}/t(95\%, n-2)}{RSD_{Range}} \right)^2}. \quad (12)$$

Методика рассматривается как линейная при выполнении требований (9) и (12). Заметим, что индекс корреляции R_c не зависит от модели $Y=f(C)$ и поэтому имеет существенное преимущество перед коэффициентом корреляции Пирсона R при оценке линейности методик. В книге [8] этот подход наиболее подробно изложен с теоретической и с практической точки зрения и приведена наиболее полная таблица с критическими значениями рассмотренных выше критериев (правые части формул (12) и (9) – при $b \approx 1$), облегчающая проведение валидации методик для тестов «Количественное определение», «Однородность дозирования» и «Растворение». Несмотря на то, что этот подход основывается на теоретических предпосылках и использует критерии «практической незначимости», он по результатам поиска в Internet применяется пока только при валидации методик в Украине и частично в РФ и в некоторых других постсоветских странах; большинство исследователей используют рекомендации ICH/USP [1, 2].

¹Англоязычный эквивалент СТОШУХ(диапазон Y; диапазон X) это STEYX(known_y's, known_x's).

Дополнительные рекомендации:

- Если при валидации методики будет установлена ее нелинейность, следует попробовать уменьшить диапазон или изменить область рассматриваемых концентраций; использовать, при необходимости, взвешенную линейную регрессию.
- Для проверки того, что определенная точка экспериментальных данных является «выбросом» относительно регрессионной модели можно использовать t -тест [11]. Вычисляют экспериментальное значение t -критерия:

$$t_{exp} = \frac{|y_i - \hat{y}_i|_{max}}{SD_0 \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_j - \bar{y})^2}{(n-1) \cdot SD_y^2}}}, \quad (13)$$

где $|y_i - \hat{y}_i|_{max}$ – максимальное абсолютное значение разности между экспериментальным y_i и расчетным \hat{y}_i (по регрессионной зависимости) значением отклика среди всех точек данных (от $i=1$ до n); n – количество экспериментальных точек; y_j – экспериментальное значение отклика в точке «выброса» j ; $\bar{y} = \sum y_i/n$; SD_0 – остаточное стандартное отклонение и SD_y – стандартное отклонение экспериментальных значений отклика y , вычисляемые по формулам:

$$SD_0 = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}, \quad SD_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}. \quad (14)$$

Сравнивают t_{exp} с табличным значением критерия Стьюдента t (95%, $f=n-2$). Если t_{exp} больше табличного значения t (95%, $f=n-2$), то с вероятностью 95% эта точка не соответствует принятой регрессионной модели и является «выбросом», требующим повторного определения y_j . Альтернативой этому тесту является F-тест, приведенный в [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены основные критерии для оценки линейности при валидации аналитических методик и их ограничения. Показано, что эти критерии по отдельности не могут дать надежную оценку линейности методики. Поэтому на практике при валидации методик следует доказывать/подтверждать их линейность с помощью двух, а надежнее – трех критериев, одним из которых должен быть график зависимости измеряемого отклика Y от концентрации определяемого вещества. С другой стороны, как показано выше, не следует формально подходить к оценке нелинейности методики при использовании графических и расчетных критериев, основанных на математической статистике, так как они не учитывают возможность практической незначимости небольших отклонений от линейной зависимости Y от C .

ЛИТЕРАТУРА

- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005; 13.
- United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of compendial procedures. USP40–NF35. 2017; 1640–1646.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Москва. 2018; 1: 276–288.
- Green J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News & Features*. 1996; 1: 305A–309A. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac961912f>.
- Эпштейн Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (Обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2004; 38(4): 40–56. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:phac.0000038422.27193.6c>
- Эрмер Й., Миллер Д. Х. Мак Б. Валидация методик в фармацевтическом анализе. Примеры наилучших практик. М.: ВИАЛЕК. 2013; 512.
- Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. Ч. I. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна и др. М.: Изд-во «Спорт и культура – 2000». 2007; 5–92.
- Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методики контроля качества лекарственных средств. Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016; 396.
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. Straight Line Regression and Calibration, in: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, volume 20A of Data Handling in Science and Technology. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 1998; 171–230. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(97\)80038-X](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(97)80038-X).
- Vial J., Jardy A. Taking into account both preparation and injection in HPLC linearity studies. *J. Chromatogr. Sci.* 2000; 38: 189–194.
- Burke S. Regression and Calibration. *LC-GC Europe Online Supplement statistics and data analysis*. 2001: 13–18.
- Kiser M. M., Dolan J. W. Selecting the Best Curve Fit. *LC-GC North America*. 2004; 22(2): 138–143.
- Mark H., Workman J. Chemometrics in Spectroscopy. How to Test for Non-linearity. *Spectroscopy*. 2005; 20(9): 26–35.
- Mark H., Workman J. Linearity in calibration: Other tests for non-linearity // *Spectroscopy*. 2005; 20(4): 38–39.
- Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, Junqueira R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 552(1-2): 25–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.
- Mark H., Workman J. Chemometrics in Spectroscopy. Linearity in Calibration: Quantifying Nonlinearity, Part II. *Spectroscopy*. 2006; 21(1): 44–54.
- Bruggemann L., Quapp W., Wennrich R. Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements. *Accred Qual Assur*. 2006; 11: 625–631. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0205-x>.
- Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part I: theory of nonlinearity and quantification of curvature. *Bioanalysis*. 2015; 7 (14): 1731–1743. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.103>.
- Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part II: a Monte Carlo justification for the use of nonlinear regressions. *Bioanalysis*. 2015; 7 (14): 1745–1761. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.104>.
- Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part III: examples of nonlinear drug assays. *Bioanalysis*. 2015; 7 (14): 1763–1774. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.105>.
- Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 77: 167–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.006>.
- Rawski R. I., Sanecki P. T., Kijowska K. M., Skital P. M., Saletnik D. E. Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies. *S. Afr. J. Chem.* 2016; 69: 166–173. DOI: <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2016/v69a20>.
- Мымриков Антон. Действительно ли ваша калибровка является прямой линией? Available at: <https://pharm-community.com/2017/8336/> (accessed 25.12.2017).
- Chemometrics in Chromatography ed. by Komsta L., Vander Heyden Y., Sherma J. Boca Raton: CRC Press. 2018; 506. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315154404>.
- Дюерфель К. Статистика в аналитической химии. М.: Муп. 1966; 211. DOI: <https://doi.org/10.1002/bimj.19690110612>.
- Эпштейн Н. А. О допустимых значениях порога игнорирования примесей и отношения сигнал/шум при проверке чувствительности хроматографической системы. *Ведомости НЦЭСМП*. 2017; 7(2): 85–91.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>.
- Rosario LoBrutto and Tarun Patel. Method Validation in HPLC for Pharmaceutical Scientists. Ed. By Kazakevich Y.V., LoBrutto R. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007; 455–502. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470087954.ch9>.
- Gao Quanyin and Sanvordeker D.R. Analytical methods development and methods validation for oral solid dosage forms in Generic Drug Product Development: Solid Oral Dosage Forms, 2-nd Ed. Shargel, Leon: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2014; 31–50.
- Дерффель К. Статистика в аналитической химии. М.: Муп, 1994; 268.
- Njaka N. A., Elise O. R., Herinirina N. R., Lucienne V. R., Manovantsoatsiferana H., R. A., Randrianarivony E. Dealing with Outlier in Linear Calibration Curves: A Case Study of Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *World Journal of Applied Chemistry*. 2018; 3 (1): 10–16.

REFERENCES

- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005; 13.
- United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of compendial procedures. USP40–NF35. 2017; 1640–1646.
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition, 2018, V.1; 276–288 (in Russ.).
- Green J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News & Features*. 1996; 1: 305A–309A. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac961912f>.
- Epstein N. A. Evaluation of the suitability (validation) of HPLC techniques in pharmaceutical analysis (Review). *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2004; 38 (4): 40–56. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:phac.0000038422.27193.6c>
- Ermer Y., Miller D.H. Mac B. Validation of methods in pharmaceutical analysis. Examples of best practices. М.: VIALEK. 2013; 512 (in Russ.).
- Guide for enterprises of the pharmaceutical industry. Guidelines. Part I. Guidelines for the validation of methods for analyzing drugs. Ed. N. V. Yurgelya, A. L. Mladentseva, A. V. Burdeina i dr. М.: Publishing house «Sport and Culture – 2000». 2007; 5–92 (In Russ.).
- Grizodub A. I. Standardized procedures for the validation of drug quality control methods. Khar'kov: Gosudarstvennoe predpriyatie «Ukrainskiy nauchnyy farmakopeyny tsentr kachestva lekarstvennykh sredstv». 2016; 396 (in Russ.).
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. Straight Line Regression and Calibration, in: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, volume 20A of Data Handling in Science and Technology. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 1998; 171–230. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0922-3487\(97\)80038-X](https://doi.org/10.1016/S0922-3487(97)80038-X).
- Vial J. and Jardy A. Taking into account both preparation and injection in HPLC linearity studies. *J. Chromatogr. Sci.* 2000; 38:189–194.
- Burke S. Regression and Calibration. *LC-GC Europe Online Supplement statistics and data analysis*. 2001: 13–18.
- Kiser M. M., Dolan J. W. Selecting the Best Curve Fit. *LC-GC North America*. 2004; 22(2): 138–143.
- Mark H., Workman J. Chemometrics in Spectroscopy. How to Test for Non-linearity. *Spectroscopy*. 2005; 20(9): 26–35.

14. Mark H., Workman J. Linearity in calibration: Other tests for non-linearity // *Spectroscopy*. 2005; 20(4):38–39.
15. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, Junqueira R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 552(1-2): 25–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.043>.
16. Mark H., Workman J. Chemometrics in Spectroscopy. Linearity in Calibration: Quantifying Nonlinearity, Part II. *Spectroscopy*. 2006; 21(1): 44–54
17. Bruggemann L., Quapp W., Wennrich R. Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements. *Accred Qual Assur*. 2006; 11: 625–631. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0205-x>.
18. Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part I: theory of nonlinearity and quantification of curvature. *Bioanalysis*. 2015; 7(14): 1731–1743. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.103>.
19. Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part II: a Monte Carlo justification for the use of nonlinear regressions. *Bioanalysis*. 2015; 7(14): 1745–1761. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.104>.
20. Burrows J, Watson K. Linearity of chromatographic systems in drug analysis part III: examples of nonlinear drug assays. *Bioanalysis*. 2015; 7(14): 1763–1774. DOI: <https://doi.org/10.4155/bio.15.105>.
21. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 77: 167–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.006>.
22. Rawski R. I., Sanecki P. T., Kijowska K. M., Skital P. M., Saletnik D. E. Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies. *S. Afr. J. Chem.* 2016; 69: 166–173. DOI: <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2016/v69a20>.
23. Mymrikov Anton. Is your calibration a straight line? Available at: <https://pharm-community.com/2017/8336/> (accessed 25.12.2017).
24. Chemometrics in Chromatography ed. by Komsta L., Vander Heyden Y., Sherma J. Boca Raton: *CRC Press*. 2018; 506. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315154404>.
25. Doerffel K. Statistik in der analytischen Chemie. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. 1966; 211. DOI: <https://doi.org/10.1002/bimj.19690110612>.
26. Epshtein N.A. About admissible values of disregard limits for impurities and signal-to-noise ratio when checking chromatographic system sensitivity // *The Bulletin of the Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017; 7(2): 85–91 (In Russ.).
27. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington. 1994. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>.
28. Rosario LoBrutto and Tarun Patel. Method Validation in HPLC for Pharmaceutical Scientists. Ed. By Kazakevich Y. V., LoBrutto R. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2007; 455–502. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470087954.ch9>.
29. Gao Quanyin and Sanvordeker D.R. Analytical methods development and methods validation for oral solid dosage forms in Generic Drug Product Development: Solid Oral Dosage Forms, 2-nd Ed. Shargel, Leon: CRC Press/Taylor & Francis Group. 2014; 31–50.
30. Doerffel K. Statistik in der analytischen Chemie. Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH: 1990; 256.
31. Njaka N. A., Elise O. R., Herinirina N. R., Lucienne V. R., Manovantsoatsiferana H., R.A., Randrianarivony E. Dealing with Outlier in Linear Calibration Curves: A Case Study of Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *World Journal of Applied Chemistry*. 2018; 3 (1): 10–16.

Рецензия на монографию

Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе

А. И. Марахова, А. А. Сорокина, В. Ю. Жилкина

Для цитирования: Марахова А. И., Сорокина А. А., Жилкина В. Ю. Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе. М.: «Ваш формат». 2017; 308 с.

К препаратам из лекарственного растительного сырья (ЛРС) в России особое отношение и использование трав было традиционным еще с XI века. Доля выпускаемых лекарственных препаратов ежегодно увеличивается. По данным компании BBC Research, в ближайшие годы ожидается рост мирового рынка лекарственных препаратов растительного происхождения на 6,6% ежегодно (Рукавицина Н.П., 2017). Эта тенденция объясняется тем, что лекарственные препараты растительного происхождения обладают комплексным воздействием, и, в большинстве своем, меньшим количеством побочных эффектов и противопоказаний. В настоящее время количество фитопрепаратов в России составляет более 40% номенклатуры лекарственных средств, выпускаемых в нашей стране.

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 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. Унифицированы подходы к анализу таких биологически активных соединений как органические кислоты, антраценпроизводные, флавоноиды, дубильные вещества в ЛРС.

Данная информация может быть весьма полезна в практике молодых исследователей и работников производств.

Несомненное достоинство книги заключается в том, что авторы систематизировали результаты исследований в форме методологии, позволяющей сделать выбор в пользу того или иного метода анализа, сформулированная на основе результатов научной работы авторов и примеров научной литературы. Данная методология позволит начинающим исследователям выстроить структуру собственных исследований, а также избежать ошибок производителям ЛРС при разработке нормативной документации предприятия.

Монографию отличает четкая структура и соподчиненность частей текста – разделов, глав, параграфов. Книга написана хорошим языком, материал изложен последовательно и систематично, конкретно, без лишних подробностей. Используются общепринятые термины, современные классификации и номенклатуры. Материал иллюстрирован рисунками, графиками, спектрами и информативными таблицами. В списке литературы приведены как актуальные труды российских, так и зарубежных ученых.

Представленная книга может быть полезна производителям ЛРС, дипломникам, аспирантам и докторантам фармацевтических ВУЗов, научным работникам.

В. Д. Белоногова,
заведующий кафедрой
фармакогнозии с курсом ботаники
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
д.фарм.н., профессор

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

В своей редакционной политике журнал следует принципам целостности публикаций в научных журналах, соответствующим положениям авторитетных международных ассоциаций, таких как Committee on Publication Ethics (COPE), Council of Science Editors (CSE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), European Medical Writers Association (EMWA) и World Association of Medical Editors (WAME), устанавливающих стандарты этического поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля «Разработка и регистрация лекарственных средств» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств», должно соответствовать науке:

- 02.00.00 – химические науки;
- 03.02.00 – общая биология;
- 03.03.00 – физиология;
- 14.04.00 – фармацевтические науки.

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75%. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал предоставляет приоритет для аспирантских и докторских работ, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия

правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.

2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – <http://www.consort-statement.org>

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате A4 Microsoft Word (*.doc), Поля 2 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта 14 пунктов через 1,5 интервала.

Объем рукописи: обзор – 15–20 страниц; оригинальные статьи – 10–12 страниц, включая литературу, таблицы и подписи к рисункам. Страницы рукописи следует нумеровать.

Перечень документов, подаваемый на рассмотрение в редакцию журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», должен включать в себя:

1. Сопроводительное письмо.
2. Текст статьи.

1. СОПРОВОДИТЕЛЬНОЕ ПИСЬМО

Авторы должны предоставить заполненное и подписанное сопроводительное письмо, приложив к нему указанные в тексте письма документы.

2. РУКОПИСЬ

РУССКОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Титульный лист:

1. УДК;
2. название статьи;
3. фамилии и инициалы авторов;
4. полные названия учреждений (надстрочными арабскими цифрами отмечают соответствие учреждений, в которых работают авторы), полный почтовый адрес учреждений;
5. e-mail и телефон автора, ответственного за контакты с редакцией

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – <http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

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. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру вы-

данных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: Синдрон-нол таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой 4 мг, производства ФАРМАТЕН С.А., Греция, серия 1100638, срок годности до 05.2013].

При описании используемых стандартных образцов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: римантадина гидрохлорид, субстанция-порошок, содержание римантадина 99,9 %, Чжецзян Апелоа Кан-го Фармацевтикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производитель, страну происхождения [Пример: ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США].

При приведении в работе первичных данных аналитических исследований (спектров, хроматограмм, калибровочных графиков) их необходимо приводить в цвете в прослеживаемом формате, с четкими разборчивыми подписями осей, пиков, спектральных максимумов и т.д.). 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.

Рукописи статей, в которых при достаточном объеме экспериментальных данных отсутствует статистический анализ, а также некорректно использованы или описаны применяемые статистические методы, могут быть отклонены редакцией журнала.

Необходимо давать определение всем используемым статистическим терминам, сокращениям и символическим обозначениям. Например, \bar{M} – выборочное среднее; m – ошибка среднего; σ – стандартное квадратичное отклонение; p – достигнутый уровень значимости и т.д. Если используется выражение типа $M \pm m$, указать объем выборки n . Если используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариативности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами, и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования, как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также авторефераты диссертаций, правильнее ссылаться на статьи, опубликованные по материалам диссертационных исследований.

Следует избегать ссылок на тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций, поскольку их названия по требованию зарубежных баз данных, должны быть переведены на английский язык. Еще не опубликованные, но принятые к печати статьи указываются «в печати» или «готовится к выходу», с добавлением письменного разрешения автора и издательства.

Недопустимо самоцитирование, кроме случаев, когда это необходимо (в обзоре литературы не более 3–5 ссылок).

Документы (приказы, ГОСТы, медико-санитарные правила, методические указания, положения, постановления, санитарно-эпидемиологические правила, нормативы, федеральные законы) нужно указывать в скобках в тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список литературы под заголовком **Литература/References** размещается в конце статьи и включает библиографическое описание всех работ, которые цитируются в тексте статьи.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

Учитывая требования международных систем цитирования, библиографические списки входят в англоязычный блок статьи и, соответственно, должны даваться не только на языке оригинала, но и в романском алфавите (латинскими буквами). Поэтому авторы статей должны представлять англоязычные источники латиницей, а русскоязычные – кириллицей и в романском алфавите. Транслитерируются фамилии авторов и русскоязычные названия источников (выделяется курсивом). Переводятся на английский язык названия статей, монографий, сборников статей, конференций с указанием после выходных данных языка источника (in Russ.). Приводится английское название журнала (название сверяется с официальным сайтом издания) через тире после транслитерации названия и оформляется курсивом.

Технология подготовки описания с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика на сайте <http://www.translit.ru>

1. Войти на сайт translit.ru. В окошке «варианты» выбрать систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставить в специальное поле ФИО авторов, название издания на русском языке и нажать кнопку «в транслит».
2. Копировать транслитерированный текст в готовящийся список.
3. Перевести с помощью переводчика Google название книги, статьи на английский язык, перенести его в готовящийся список. Перевод, безусловно, требует редактирования, поэтому данную часть необходимо готовить человеку, понимающему английский язык.
4. Объединить транслитерируемое и переводное описания, оформляя в соответствии с принятыми правилами.
5. В конце описания в круглых скобках указывается (in Russ.).

Образец оформления списка литературы

Литература/References

1. Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева, 2015:272 [Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. Introduction to psychopharmacogenetics. St.-Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva, 2015:272 (in Russ.)].
2. Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013; 15 (1):20–23 [Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer] *Onkologiya – Oncology*. 2013; 15(1): 20–23 (in Russ.)].
3. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*. 2008; 7 (1): 58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.
4. Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства, либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. Не допустимо сокращать название статьи.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Монографии

Выходные данные указываются в следующей последовательности: фамилия и инициалы автора (авторов), название монографии (полностью раскрывая все слова), номер повторного издания, место издания (город), издательство, год издания, количество страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009:328 [Sokolova G. N., Potapova V. B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009:328 (in Russ.)].

Для англоязычных источников

Jenkins P. F. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press, 2005: 194.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название ста-

тьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Шишкин С. В., Мустафина С. В., Щербакова Л. В., Симонова Г. И. Метаболический синдром и риск инсульта в популяции Новосибирска. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014; 13 (3): 53–57 [Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014; 13 (3): 53–57 (in Russ.)].

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L. B. Obesity among individuals with serious mental illness. *Acta Psychiatr Scand*. 2006; 113 (4): 306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/>

Варианты библиографического описания патентов: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/>

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/>
DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте <http://search.crossref.org/> или <https://www.citethisforme.citethisforme.com>.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.



Обучающий курс для предприятий «Тест «Растворение» и СТПР в разработке и регистрации лекарственных средств» лекарственных средств»

*«В подавляющем большинстве случаев причиной неудач в исследовании
биоэквивалентности дженерика является неэквивалентность кинетики
растворения препаратов»*

GLP/ISO-9001-сертифицированная лаборатория «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» приглашает на обучающий курс для предприятий «Тест «Растворение» и СТПР в разработке и регистрации лекарственных средств».

Курс предназначен для сотрудников отделов разработки, контроля качества, обеспечения качества, регистрации лекарственных средств.

Слушатели предварительно могут прислать список интересующих их вопросов по теме семинара, которые обязательно будут рассмотрены. Обучение построено по принципу **адаптивного семинара**, поэтому длительность каждой из лекций, уровень сложности (базовый или продвинутый) и тематические акценты определяется исходя из потребностей аудитории. Курс также подразумевает решение ситуационных задач и практических занятий. По окончании семинара проводится тестирование слушателей и выдача сертификатов участника.



Курс читает генеральный директор ООО «ЦФА» доктор фармацевтических наук **Шохин Игорь Евгеньевич**.

Главный редактор научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Ведущий переводчик и научный редактор русского издания Европейско Фармакопеи.

Председатель оргкомитета цикла конференций «Исследования кинетики растворения, фармакокинетики и биоэквивалентности».

Автор монографии «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств».

Стоимость мероприятия **9 900 руб.** с человека (для групп численностью 10 человек и более. Для групп менее 10 человек стоимость обучения составляет 99 000 руб./группа)*.

Обучение может проводиться как на базе ООО «ЦФА» (г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3), так и на базе Вашего предприятия в удобное для Вас время.

*Стоимость проезда, проживания и командировочные расходы при проведении выездного семинара за пределами Москвы оплачивается отдельно.

Курс проводится при технической поддержке

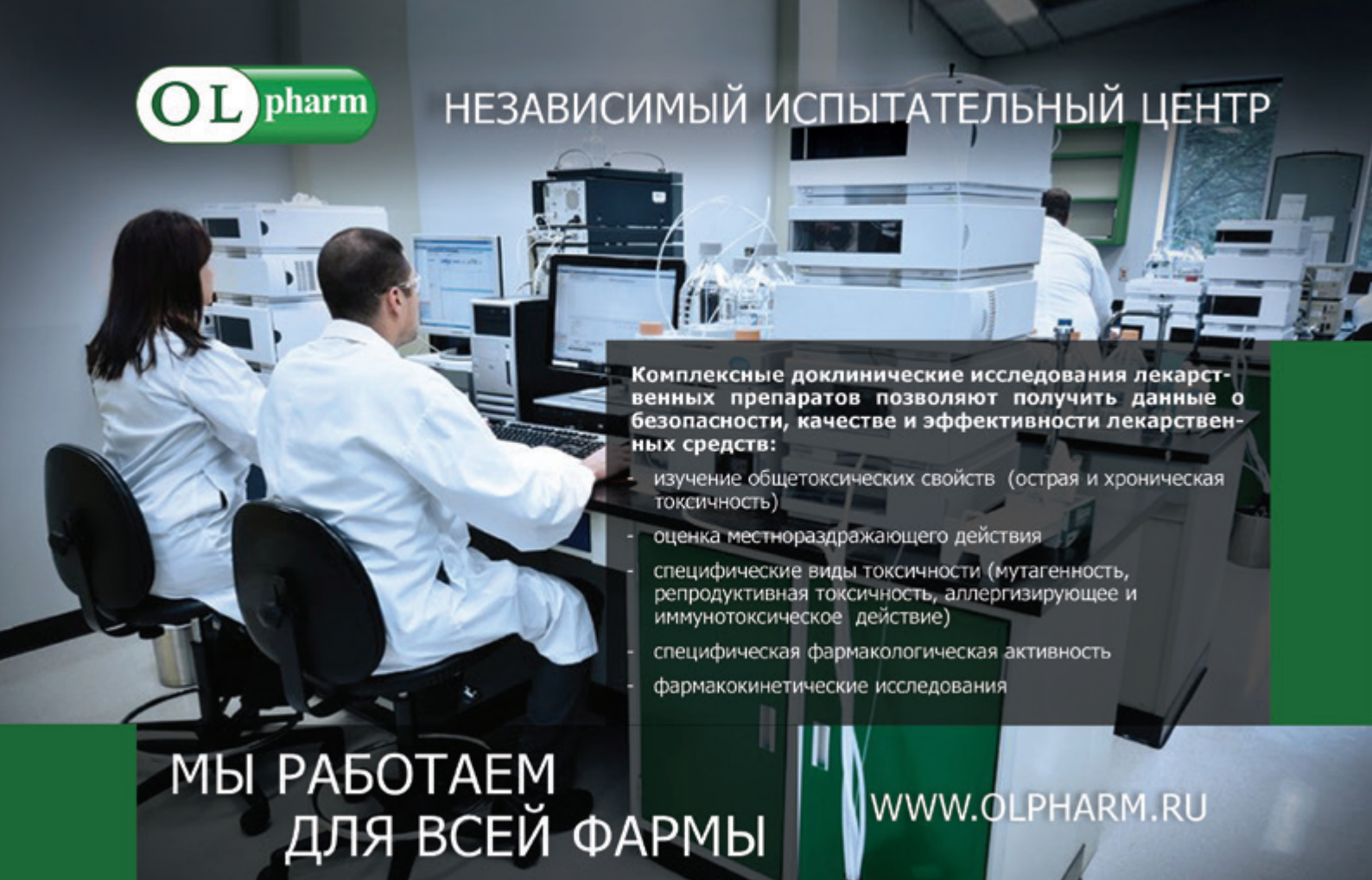
ERWEKA



ООО «ЦФА»

Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Тел: +7 (499) 281-81-11 info@cpha.ru www.cpha.ru



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутagenность, репродуктивная токсичность, алергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10
от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09
от 30.04.2009 на выполнение работ с
микроорганизмами 3-4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU



LABWARE
lims

LABWARE
eln

LABWARE

Компания LabWare признанный мировой поставщик
Лабораторных информационных менеджмент систем
с более чем 30-ти летним опытом:

- Более 1500 компаний и свыше 100 000 пользователей ежедневно работают в ЛИМС LabWare;
- LabWare охватывает 5 континентов и более 130 стран мира.

Основные преимущества продукта LabWare:

- ЛИМС LabWare подходит для любой отрасли вне зависимости от масштаба предприятия и области деятельности лаборатории;
- Полнофункциональный конфигурируемый продукт класса GAMP;
- Полная локализация пользовательского интерфейса;
- Возможность реализации любых задач современной лаборатории при помощи более чем 600 модулей;
- Широкие возможности интеграции со смежными автоматизированными системами и оборудованием любой сложности
- Соответствие как международной, так и отечественной нормативной документации;
- Преемственность и естественная миграция данных при переходе на новые версии.

Выбирая LabWare, Вы можете быть уверены, что получите:

- Лучший продукт на мировом рынке ЛИМС;
- Надежного и ответственного партнера в долгосрочной перспективе;
- Максимальную отдачу и быстрый возврат инвестиций;
- Основанную на передовых технологиях ЛИМС, которая будет расти и развиваться вместе с Вашей компанией.



На территории России и стран СНГ представлять
компанию LabWare уполномочено ООО "ЛАБВЭА"

ООО "ЛАБВЭА" г. Москва, тел.: +7 (495) 134 3747, e-mail: info@labware.ru
www.labware.ru www.labware.com