

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

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

ЦФА | центр
фармацевтической
аналитикиРасписание обучающих мероприятий
в Центре Фармацевтической Аналитики на период сентябрь-декабрь 2019 г.

№	Название курса	Даты проведения	Стоимость
1	Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств	10–11 октября	14 900 руб./слушатель
2	Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: базовый курс	24–25 октября	14 900 руб./слушатель
3	Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: продвинутый курс	7–8 ноября	14 900 руб./слушатель
4	Исследования фармакокинетики и биоэквивалентности: надлежащая и ненадлежащая практика	28–29 ноября	14 900 руб./слушатель
5	СМК и GLP в исследовательских лабораториях: внедрение и реализация на практике	12–13 декабря	14 900 руб./слушатель

Скидки при заказе трех и более разных курсов: 30%
Стоимость выездного семинара по любой из указанных тем у Вас на предприятии стоимость обучения составляет 99 000 руб./группа*
Для участия в семинаре необходимо прислать в свободной форме заявку на адрес info@cpha.ru

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

Место проведения: г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2, АО «Технопарк «Слава»



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 19.1198.026 от 18 июля 2019 г. Сертификат действителен до 3 августа 2022 г.; ГОСТ Р ИСО 9001:2015 в системе Ассоциации по сертификации «Русский Регистр» с аккредитацией Федеральной службы по аккредитации РФ (Росаккредитации), № 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), определение противолечных антител к биологическим лекарственным препаратам.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

**РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**



При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2019. Том 8, № 3

RAZRABOTKA I REGISTRACIÂ LEKARSTVENNYH SREDSTV

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2019. Volume 8, No. 3

Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения. **Первый** раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств, **второй** – фармацевтической технологии и рассматривает научные и практические направления от разработки и производства исходных фармацевтических ингредиентов, технологий и оборудования – до создания стандартных и терапевтически эффективных лекарственных препаратов. **Третий** раздел описывает аналитические методики контроля качества; **четвертый** раздел посвящен подходам к оценке эффективности и безопасности лекарственных средств, проведению доклинических и клинических исследований; в **пятом** разделе рассматриваются вопросы валидации методики, подготовки регистрационного досье, жизненный цикл лекарственного препарата в GxP окружении. Журнал принимает к рассмотрению обзорные и экспериментальные статьи по данной тематике. К публикации в журнале приглашаются как отечественные, так и зарубежные исследователи в области разработки и регистрации лекарственных средств.

Редакционная коллегия

Главный редактор

Шохин И. Е., д.фарм.н., генеральный директор ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», Москва, Россия

Редакционная коллегия

Аммур Ю. И., к.биол.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Белоусов М. В., профессор, д.фарм.н., заведующий кафедрой фармации ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия

Боян Салия, Assist. Professor, PhD, University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Белград, Сербия

Василенко И. А., проф., д.х.н., профессор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Хуторянский В. В., к.х.н., Prof., BSc MSc PhD MRSC, School of Pharmacy, University of Reading, Рединг, Великобритания

Гузев К. С., д.ф.н., уполномоченное лицо АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва, Россия

Гусаров Д. А., к.х.н., руководитель группы экспериментального биотехнологического производства Научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Демина Н. Б., проф., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Емшанова С. В., д.фарм.н., начальник отдела научных разработок ЦКП (НОЦ) ФГАОУ РУДН, Москва, Россия

Комаров Т. Н., к.фарм.н., старший химик-аналитик ООО «ЦФА», Москва, Россия

Кулинич Ю. И., к.фарм.н., эксперт 1 категории ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Макеев О. Г., проф., д.м.н., зав. кафедрой биологии и медицинской генетики УГМУ, Екатеринбург, Россия

Малашенко Е. А., к.фарм.н., ст.преп. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Медведев Ю. В., к.фарм.н., доц. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Мельников Е. С., к.фарм.н., старший научный сотрудник ЦКФ ФГБУ НЦ ЭСМП Минздрава России, Москва, Россия

Мустафин Р. И., к.фарм.н., директор Института фармации ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России, Казань, Республика Татарстан

Оборотова Н. А., проф., д.фарм.м., НИМЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

Попов В. В., проф., д.м.н., зав. лабораторией профессиональной клинической фармакодинамики НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия

Русинов В. Л., чл. корр. РАН, д.х.н., директор Химико-технологического института ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Скорик Ю. А., доц., к.х.н., руководитель лаборатории природных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

Сливкин А. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Focus and Scope of the journal

Research and production peer-reviewed journal «**Drug development & registration**» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) is an up-to-date quarterly free application publication and information portal for Professionals involved in the circulation of medicines. Journal is designed for pharmaceutical manufacturers and their employees from the departments of development, quality control, registration, production and development; employees of laboratory centers, contract research organizations, scientific and educational institutions. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of drug development and registration, to increase the scientific and practical qualifications of specialists in the field of drug circulation. The main **five thematic sections** of the journal «Drug development & registration» (Razrabotka i registraciâ lekarstvennyh sredstv) include the development lifecycle of a drug product from its creation to obtaining a marketing authorization. The **first** section is devoted to the research and development of new medicines, the **second** one provides information about pharmaceutical technology, pharmaceutical ingredients, and equipment for drug development. The **third** section describes analytical quality control methods; the **fourth** section is devoted to approaches to evaluating the efficacy and safety of medicines, conducting clinical and preclinical studies. The **fifth** section deals with the validation of methods, preparation of the registration dossier, the life cycle of the drug product in the GxP environment. Journal accepts for consideration both review and original papers. Both domestic and foreign researchers in the field of drug development and registration are invited to publication in the journal.

Editorial board

Editor-in-Chief

Igor E. Shohin, Dr. of Sci. (Pharm.), CEO in LLC Center of Pharmaceutical Analytics (ООО Center of Pharmaceutical Analytics/ООО «ЦПА»), Moscow, Russia

Editorial board

Yulia I. Ammour, Cand. of Sci. (Biol.), Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera of RAMS, Moscow, Russia

Mikhail V. Belousov, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Boyan R. Calija, as. Prof., PhD (Serbia), University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Ivan A. Vasilenko, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Vitaliy V. Khutoryanskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.) (UK), University of Reading, Reading, United Kingdom

Konstantin S. Guzev, Retinoid Company, Dr. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Dmitriy A. Gusarov, MIREA – Russian Technological University (RTU MIREA), Dr. of Sci. (Chem.), Moscow, Russia

Natalia B. Diomina, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Svetlana V. Emshanova, Dr. of Sci. (Pharm.), RUDN University, Moscow, Russia

Timofey N. Komarov, Cand. of Sci. (Chem.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Julia I. Kulinich, Cand. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Oleg G. Makeev, Prof., Dr. of Sci. (Med.), The Central Research Laboratory of the Ural Medical University, Yekaterinburg, Russia

Evgeniya A. Malashenko, Cand. of Sci. Pharm., Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Yury V. Medvedev, Cand. of Sci. (Pharm.), Center of Pharmaceutical Analytics, Moscow, Russia

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), Moscow, Russia

Rouslan I. Moustafine, Cand. of Sci. (Pharm.), Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan

Natalia A. Oborotova, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Vladimir V. Popov, Prof., Dr. of Sci. (Med.), Joint Stock Company «Russian Railways», Moscow, Russia

Vladimir L. Rusinov, RAS c.-m., Dr. of Sci. (Chem.), Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Yury A. Skorik, Cand. of Sci. (Chem.), Institute of Macromolecular Compounds, Saint-Petersburg, Russia

Aleksei I. Slivkin, Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Смехова И. Е., профессор кафедры технологии лекарственных форм. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия
Станишевский Я. М., д.х.н., проф., директор Института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ РУДН, Москва, Россия
Сукоян Г. В., д.б.н., Международный центр внедрения новых биомедицинских технологий, Тбилисский государственный университет имени Ивана Джавахишвили, Тбилиси, Грузия
Сысоев Б. Б., профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Ташлицкий В. Н., к.х.н., старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
Тринева О. В., д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
Чучалин В. С., д.фарм.н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия
Эпштейн Н. А., к.х.н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

Учредители печатной версии

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

Учредители онлайн версии

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Издатель

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)
Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

Директор журнала
Кульджанова Н. В.

Заведующий редакцией
Михайлова Н. С.

Дата выхода в свет журнала: ноябрь 2012 г.

Журнал выходит периодичностью 4 раза в год

Адрес редакции
Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. Тел.: +7 (499) 281-81-11
www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии
ООО «МАКС ПРЕСС», Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103

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

Префикс DOI: 10.33380/2305-2066

Тираж 999 экземпляров

Условия распространения материалов:
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

Свободная цена

Irina E. Smekhova, Dr. of Sci. (Pharm.), Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

Yaroslav M. Stanishevskiy, Prof., Dr. of Sci. (Chem.), RUDN University, Moscow, Russia

Galina V. Sukoyan, Dr. of Sci. (Biol.) (Georgia), International Centre of Introduction of New Biomedical Technology, Tbilisi, Georgia

Boris B. Sysuev, as. Prof., Dr. of Sci. (Pharm.), Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Vadim N. Tashlitsky, Cand. of Sci. (Chem.), Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Ol'ga V. Trineeva, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Vladimir S. Chuchalin, Dr. of Sci. (Pharm.), Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Naum A. Epshtein, Cand. of Sci. (Chem.), Irvin-2 Company, Moscow, Russia

Print version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

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

Address: 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

Siberian State Medical University

Address: 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

Online version founders

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

Publisher

LLC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA»)

Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

Journal director

Natalia V. Kul'djanova

Managing Editor

Nadezhda S. Mikhaylova

Date of publication of the magazine: November 2012

The journal is published at intervals of 4 times a year

Editorial office address

20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia. Tel.: +7 (499) 281-81-11
www.pharmjournal.ru e-mail: info@pharmjournal.ru

Printing office

LLC «MAX PRESS», 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia

Journal is registered in Russian index of scientific citation

Registration certificate:

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

DOI prefix: 10.33380 / 2305-2066

Circulation: 999 copies

Content distribution terms:

Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Free Price

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

Содержание

Contents

От редакции	7	Introduction
Мероприятия	11	Events
Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»		«Research and development of new drug products» part
А. А. Шадрин, Д. Ю. Ивкин, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова, Г. А. Плиско, А. А. Карпов, Е. Д. Семивеличенко	14	Aleksey A. Shadrin, Dmitriy Y. Ivkin, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova, Grigoriy A. Plisko, Andrey A. Karpov, Evgeniy D. Semivelichenko
Исследование высвобождения лерканидипина из двухкомпонентного лекарственного препарата в комбинации с рамиприлом <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>		Study of Lercanidipine Drug Release from Medicine in Combination with Ramipril <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
А. В. Корочинский, Ж. В. Дайронас, В. В. Верниковский, И. Н. Зилфикаров, Э. Ф. Степанова, М. В. Черников	21	Alexey V. Korochinsky, Janna V. Daironas, Vladislav V. Vernikovskiy, Ifrat N. Zilfikarov, Eleonora F. Stepanova, Maxim V. Chernikov
Актуальные аспекты медицинского применения ореха черного – <i>Juglans nigra</i> L. (обзор)		Actual Aspects of Medical Application of Black Nut – <i>Juglans Nigra</i> L. (Review)
Д. Н. Косарева, Е. П. Ананьева, А. А. Иоэп	30	Daria N. Kosareva, Elena P. Ananieva, Anatolii A. Iozep
Антимикробная активность N-арилден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты		Antimicrobial Activity of N-ariliden(alkylidene)hydrazides of Carboxymethylalginic Acid
Раздел «Фармацевтическая технология»		«Pharmaceutical Technology» part
С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова	35	Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova
Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного с высоким содержанием биологически активных веществ		Choice of Extraction Method for Receiving Extraction from Seeds of Payne Hay with the High Content of Biologically Active Substances
В. Г. Гуляев, И. В. Гуляев	40	Valery G. Gulyaev, Ivan V. Gulyaev
Способ экспрессного измерения влажности пневмотранспортируемого сыпучего материала в фармацевтическом производстве, основанный на эффекте Поккельса (обзор)		The Method of Express Measurement of Moisture of Bulk Material During Pneumo Transport Process in the Pharmaceutical Industry, Based on the Pockels Effect (Review)
А. Н. Голубев, Т. Ш. Нгуен, А. В. Басевич, В. В. Сорокин, И. Е. Каухова, А. Л. Марченко, Е. М. Смирнова	45	Artem N. Golubev, Thi S. Nguyen, Anna V. Basevich, Vladislav V. Sorokin, Irina E. Kaukhova, Aleksei L. Marchenko, Elena M. Smirnova
Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design		Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design
С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич, В. Г. Лужанин, С. В. Шилов, К. О. Новикова	49	Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich, Vladimir G. Luzhanin, Sergey V. Shilov, Kseniya O. Novikova
Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного		Comparative Analysis of Perspective Extragation Methods for Receiving Extractions from Fenugreek Seeds
Раздел «Методы анализа лекарственных средств»		«Analytical Methods» part
В. И. Ноздрин, Г. А. Пьявченко, М. Е. Иванова, К. С. Гузев, С. Л. Кузнецов	57	Vladimir I. Nozdrin, Gennadii A. Piavchenko, Margarita E. Ivanova, Konstantin S. Guzev, Sergey L. Kuznetsov
Изучение некоторых параметров фармакокинетики фенола, входящего в состав пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции		Evaluation of Pharmacokinetical Parameters of Phenol, a Component of Antiseptic Dorogov's stimulator 3 Fraction Paste
Е. С. Березина, А. Л. Голованенко, И. В. Алексеева	62	Elena S. Berezina, Anna L. Golovanenko, Irina V. Alekseeva
Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ в пленках для лечения кариеса дентина		Validation of Methods of Identification and Quantitative Determination of Active Ingredients in Films for Treatment of Caries of Dentin

Раздел «Доклинические и клинические исследования»

Н. Б. Абраменко, П. И. Внукова, Е. С. Головина,
И. Е. Макаренко, А. А. Мосикян, А. Г. Никифорова,
П. В. Гремякова, В. И. Казей

Разработка и валидация методики определения
нейтрализующих антител к инсулину (гларгин)
в плазме крови человека

Е. Н. Фишер, Е. С. Мельников, И. Е. Шохин

Разработка и валидация методики количественного
определения бусерелина в плазме крови животных

Е. Н. Блохина, Н. В. Келус, В. С. Чучалин

Влияние способа пробоподготовки образцов биологической
природы на результаты определения тяжелых металлов
методом атомно-эмиссионной спектроскопии

М. А. Колганова, Н. С. Багаева, Ю. В. Медведев,
И. Е. Шохин, А. В. Демчинская, Т. В. Палкина,
Д. А. Салазанов, Г. Е. Коноплева, М. С. Шереметьева,
Ш. З. Арчуадзе, Я. Лавровский, А. Ю. Савченко,
М. Ю. Самсонов

Сравнительное исследование фармакокинетики
и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба
(RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального
биотехнологического препарата Авастин®
(Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных
группах при однократном внутривенном введении у здоровых
добровольцев

Раздел «Регуляторные вопросы»

А. Л. Хохлов, Д. П. Ромодановский,
А. Е. Мирошников

Планирование и оценка исследований биоэквивалентности
воспроизведенных препаратов телмисартана

«Preclinical and clinical study» part

70 Natalia B. Abramenko, Polina I. Vnukova, Elena S. Golovina,
Igor E. Makarenko, Anna A. Mosikyan, Aiyya G. Nikiforova,
Polina V. Gremyakova, Vasily I. Kazey

Development and Validation of Approach for the Detection
of Neutralizing Antibodies Against Insulin (Glargine)
in Human Blood Plasma

79 Elizaveta N. Fisher, Evgueniy S. Melnikov, Igor E. Shohin

Development and Validation of HPLC-MS/MS Method
for Busereline Quantitation in Animal Blood Plasma

86 Elena N. Blokhina, Nadezhda V. Kelus, Vladimir S. Chuchalin

Influence of the Method of Treatment of Samples
of Biological Nature on the Results of Determination
of Heavy Metals by Atomic Emission Spectroscopy

91 Maria A. Kolganova, Natalia S. Bagaeva, Yuri V. Medvedev,
Igor E. Shohin, Anna V. Demchinskaya, Tatyana N. Palkina,
Dmitry A. Salazanov, Galina E. Konopleva, Marina S. Sheremeteva,
Shorena Z. Archuadze, Yan V. Lavrovsky, Alla Yu. Savchenko,
Mikhail Yu. Samsonov

A Comparative Parallel Study of Pharmacokinetics and
Immunogenicity Following Single Intravenous Administration
of Bevacizumab Biosimilar RPH-001 (Manufactured
by R-Pharm Group, Russia) and Avastin® (Manufactured
by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland)
in Healthy Male Volunteers

«Regulatory Issues» part

101 Alexandr L. Khokhlov, Dmitry P. Romodanovsky,
Alexey E. Miroshnikov

Planning and Evaluation of Bioequivalence Studies of Telmisartan
Generic Drug Products

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.
- ✓ Дженерики 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**

ЕДИНСТВО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ: СТАНДАРТЫ GxP В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

27 июня 2019 г. состоялась научно-практическая конференция с международным участием «**Единство фармацевтической и клинической разработки: стандарты GxP в жизненном цикле лекарственных средств**». Организаторами конференции выступили Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик (ГИЛСиНП) и Центр Фармацевтической Аналитики (ЦФА), со-организаторами – компании ERWEKA, X7 Research и CRODA RUS. Информационным партнёром мероприятия традиционно был научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Конференция была открыта директором журнала «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» **Натальей Кульджановой**. В рамках своего доклада директор журнала представила информацию о деятельности информационного портала «Разработка и регистрация лекарственных средств», а также возможные варианты партнёрского сотрудничества. Печатная версия журнала распространялась в ходе мероприятия бесплатно.

Директор Института биохимических технологий и нанотехнологий Российского университета дружбы народов (ИБХТН РУДН) **Я. М. Станишевский** презентовал магистерскую программу «Биофармацевтические технологии и управление фармпроизводством» по специальности 33.04.01 «Промышленная фармация», предназначенную для будущих руководящих лиц предприятий.

Научная программа конференции состояла из трёх секций: **GMP-секция, GCP-секция и GLP-секция**. Производственная секция конференции была представлена докладами **Олеси Верещагиной** «Обеспечение качества лекарственных средств при их разработке в соответствии с GMP за счет применения Super Refined эксципиентов», **Вячеслава Горячкина** (ГИЛСиНП) «GMP инспекторат РФ», **Владимира Смирнова** (ГИЛСиНП) «Примеры несоответствий в процессе упаковки лекарственных средств» и **Ильи Петрова** (Эрвека) «Оборудование для теста «Растворение»: применение на всём жизненном цикле лекарственного средства».



В ходе доклада **Олеси Верещагиной** «**Обеспечение качества лекарственных средств при их разработке в соответствии с GMP за счет применения Super Refined эксципиентов**» были освещены такие актуальные вопросы, как принцип разработки новых лекарственных средств в соответствии с требованиями GMP, обеспечение высокого качества путем разработки, влияние чистоты вспомогательных веществ на эффективность конечных рецептур. Рассмотрев главные цели фармразработки, выделили требование ICH Q8: качество необходимо заложить при разработке и обеспечить при производстве. Кроме того, современная концепция гарантии качества QbD говорит о том, что определение целевого профиля качества ЛП, критических показателей качества АФИ и вспомогательных веществ, определяют успех разработок, в том числе дженериков, которые обязаны быть биоэквивалентными оригиналам.

На примере Полисорбата 80 и ПЭГ 400 были продемонстрированы естественные процессы деградации самих вспомогательных веществ с формированием различных продуктов разложения (перекисей, кислот, альдегидов), что влияет на стабильность активных фармацевтических ингредиентов, включая белки.

В качестве эффективного решения освещенных задач и проблем компания «Крода РУС» предлагает вспомогательные вещества супер-очистки. Super Refined продукты обеспечивают соответствие разрабатываемых рецептур современным требованиям стабильности, а значит, максимизируют эффективность разработок и безопасность лекарственных препаратов.

После перерыва слушателям были предложены доклады, посвященные надлежащей клинической практике: **Екатерины Красовской** (Вита Этерна) «Возможные «неудачи» и ошибки в исследованиях биоэквивалентности. Пути решения», **Дмитрия Крюкова** (X7 Research) «Органи-



ганизация собственного центра ранних фаз и БЭ: опыт контрактно-исследовательской организации» и **Игоря Шохина** (ЦФА) «**Выбор биосерии препаратов как составляющая успеха сравнительного клинического исследования**». Генеральный директор ООО «ЦФА» особо отметил необходимость серьезного и внимательного отношения к выбору биосерии лекарственных средств до проведения клинического исследования, в том числе исследований биоэквивалентности и биоаналогичности, а также описал современные методы анализа, применяемые для данной цели, в том числе проведение сравнительного теста кинетики растворения с применением биорелевантных сред.

В ходе доклада **Дмитрия Крюкова** «**Организация собственного центра ранних фаз и БЭ: опыт контрактно-исследовательской организации**» обсуждались важные вопросы перспектив развития медицинских центров, специализирующихся на проведении исследований биоэквивалентности в России. Вот некоторые из этих вопросов:

Структура фармацевтического рынка за 2018 год

Современный рынок лекарственных средств в России представлен в большей степени препаратами-дженериками, о чем свидетельствует дан-





ные аналитики DSM-group. Так соотношение рынка продаж дженериков и оригинальных препаратов составляет 61% против 39% в рублях. Преобладание препаратов-дженериков на рынке приводит к необходимости проведения исследований биоэквивалентности с целью обеспечения более качественного рынка новых препаратов.

Структура рынка клинических исследований за I квартал 2019

При анализе структуры рынка клинических исследований наблюдается тенденция увеличения доли исследований биоэквивалентности иностранных дженериков по сравнению с 2017 годом с 10% до 10,6%, в то время как доля отечественных дженериков осталась на том же уровне – 21,6%. (по данным www.grls.rosminzdrav.ru и АОКИ бюллетень № 18). Это объясняется необходимостью перерегистрации препаратов в соответствии с требованием ЕАЭС до 2025 года.

Требования, предъявляемые к современным медицинским центрам БЭ

К слагаемым успешного Центра относятся – необходимые помещения, современное оборудование, обеспечение системы качества, высококвалифицированный персонал. Ключевым аспектом технического обеспечения является наличие оборудования для хранения биоматериалов, препаратов и т. д., поддерживающего низкие температуры, систем круглосуточного видеонаблюдения, центрального времени, оповещения, обеспечение круглосуточной работы реанимационного отделения. Персонал, специализирующийся только на клинических исследованиях и биоэквивалентности, обязан постоянно поддерживать уровень квалификации. Также необходимо обеспечить функционирование специализированных помещений, таких как палаты добровольцев, рассчитанные минимально на 30 коек, помещений для хранения препаратов, диагностических отделений, процедурных кабинетов, кабинетов врачей. Обеспечение медицинской поддерж-



кой всех пациентов является неотъемлемой частью качественной работы Центра клинических исследований.

Ведущие компании в сфере клинических исследований, такие как X7 Research имеют собственные центры для проведения исследований. Открытие собственного центра клинических исследований в данный момент является перспективным направлением в связи со сложившейся конъюнктурой фармацевтического рынка России.

Закрывала конференцию секция надлежащей лабораторной практики, в рамках которой прозвучали доклады **Арины Селезневой** (ГИЛСиНП) «Трудности испытательных центров и производителей лекарственных средств на этапе доклинических исследований и возможные пути их решения с применением мировых практик» и **Василия Казея** (Экзакте Лабс) «Последствия несоблюдения GxP-стандартов при организации и выполнении

исследования биоэквивалентности». Последний доклад перешёл в дискуссию, посвященную необходимости государственного контроля качества работ биоаналитических лабораторий в системе стандартов GLP. Было отмечено, что ГИЛСиНП потенциально готов выполнять данную контролирующую функцию.

Мероприятие было завершено торжественным фуршетом и свободным общением. Конференцию посетили около 100 слушателей из фармацевтических компаний, ВУЗов и исследовательских организаций Москвы, Санкт-Петербурга, Ярославля и других городов России, а также Республики Беларусь. Слушатели отметили высокий уровень мероприятия, как научный, так и организационный, и призвали организационный комитет продолжать проведение подобных конференций в дальнейшем.



«Аналитика Экспо 2019»: рост числа посетителей на новой площадке

С 23 по 26 апреля 2019 года в Москве с успехом прошла 17-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо».



Выставка «Аналитика Экспо» в этом году впервые проходила на новой площадке МВЦ «Крокус Экспо», удобство и транспортную доступность которой оценили участники и посетители.

В 2019 году в выставке приняла участие 241 компания из 24 стран мира, в том числе из стран – признанных лидеров аналитического приборостроения – Японии, США, Австрии, Испании, Франции, Китая. 39 компаний продемонстрировали свою продукцию на выставке впервые.

В рамках экспозиции участники представили оборудование и продукцию ведущих брендов лабораторной техники: Analytik-Jena, Bruker, Fritsch, Lauda, Miele, Rigaku, Sartorius, Shimadzu, Thermo Fisher Scientific, Velder, Снол-терм, Хроматэк и других, новинки оборудования и инновационные разработки в области аналитической химии.

За 4 дня проведения выставку посетили 6 020 специалистов из 36 зарубежных стран и 63 регионов России. Это на 5% больше, чем в прошлом году.

На выставке были также анонсированы новые разделы и тематика, которые появятся в 2020 году – это раздел «Оборудование для биотехнологий» и «Контрольно-измерительное оборудование».

Научно-деловая программа

Выставка традиционно сопровождалась научно-деловой программой, которая включала мероприятия разной тематики и формата для специалистов-аналитиков различных отраслей – открытие и бесплатные для посещения. Партнёрами деловой программы выступили Научный совет по аналитической химии РАН, ААЦ «Аналитика», Всероссийское масс-спектрометрическое общество, и кластер передовых производственных технологий Фонда Сколково. За четыре дня выставки мероприятия деловой программы посетили более 1100 человек.

Ключевым мероприятием стал трехдневный конгресс «Дни Separation Science», в рамках которого более 25 ведущих российских ученых представили результаты своих исследований. Конгресс был организован в сотрудничестве с Всероссийским масс-спектрометрическим обществом и ИФХЭ им. А. Н. Фрумкина РАН. Каждый из дней конгресса был посвящен отдельному аспекту наук о разделении и физической химии. Спонсором дня «Масс-спектрометрия и ее прикладные задачи» выступила компания «СКБ «Хроматэк».





26 апреля впервые в рамках выставки состоялся День молодого специалиста, в котором приняли участие студенты и учащиеся более 20 учебных заведений, включая МГУ им. М.В. Ломоносова, РУДН, РХТУ им. Д. И. Менделеева и других. Для будущих профессионалов в сфере химического анализа был организован лекторий от деятелей науки и практиков, а также экскурсии по выставке телеведущего и блогера Александра Иванова, автора Youtube-канала «Химия – просто». В этот же день на площадке впервые работала VR-зона, где посетители выставки отрабатывали некоторые элементы лабораторного практикума в виртуальной реальности. Для преподавателей вузов и колледжей состоялся круглый стол по проблемам профессионального образования. Специалисты обсудили вопросы соответствия профессиональных и образовательных стандартов и новые образовательные технологии.

В этом году в деловой программе были предусмотрены специализированные мероприятия – семинары по неинвазивной лабораторной диагностике, анализу минерального сырья, дискуссионная сессия по разработке, производству и выводу на рынок аналитического оборудования. Вновь состоялся семинар по аккредитации лабораторий от экспертов ААЦ «Аналитика», где эксперты на практических примерах разобрали сложные ситуации, связанные с прохождением процедуры аккредитации, а специалисты ГК «ВИАЛЕК» во второй раз провели на выставке обу-



чающие семинары для персонала фармацевтических производств.

24 апреля в рамках выставки состоялось награждение Лауреатов Конкурса на соискание Знака качества «За обеспечение высокой точности измерений в аналитической химии». Проведение экспертной оценки продукции, номинированной на Знак качества «За обеспечение высокой точности измерений в аналитической химии», было возложено на Экспертную комиссию, сформированную на базе ФБУ «Ростест-Москва».

Организаторами Конкурса выступили Ассоциация «РОСХИМРЕАКТИВ» и ИТЕ. В этом году по результатам экспертной оценки Знака качества «За обеспечение высокой точности измерений в аналитической химии» были удостоены 9 наименований продукции 6 предприятий.



В 2019 году на одной выставочной площадке «Крокус Экспо» впервые одновременно прошли три крупных отраслевых мероприятия, что позволило создать синергетический эффект для бизнес-аудитории выставок. 16-ю Международную выставку лабораторного оборудования и технологий «НЕФТЬ И ГАЗ»/MIOGE 2019, 23-ю Международную выставку машин и оборудования для добычи, обогащения и транспортировки полезных ископаемых MiningWorld Russia и 17-ю Международную выставку лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо» в общей сложности посетили более 15 000 специалистов, большинство из которых принимают решения о закупках в своих компаниях и влияют на распределение бюджета.

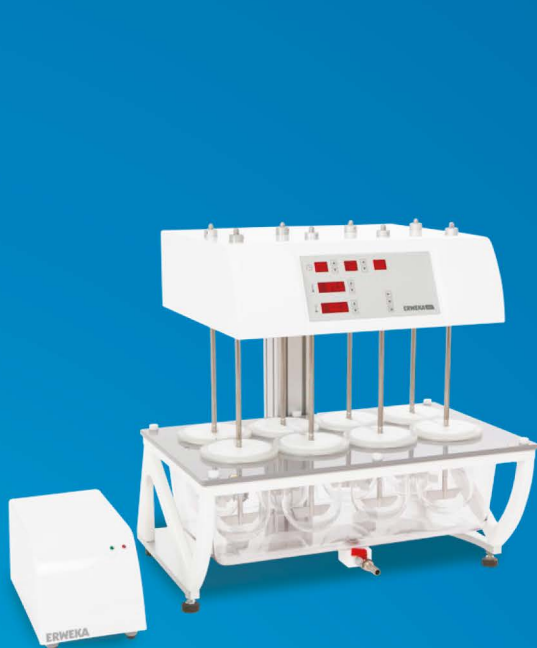
Генеральным спонсором выставки выступила компания ДИАЭМ.

Официальным спонсором – компания ООО «Энерголаб».

В 2020 году 18-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо» состоится с 21 по 24 апреля в МВЦ «Крокус Экспо» (м. Мякинино).

Серия тестеров растворения ERWEKA DT light

Экономичные тестеры с ручным отбором проб

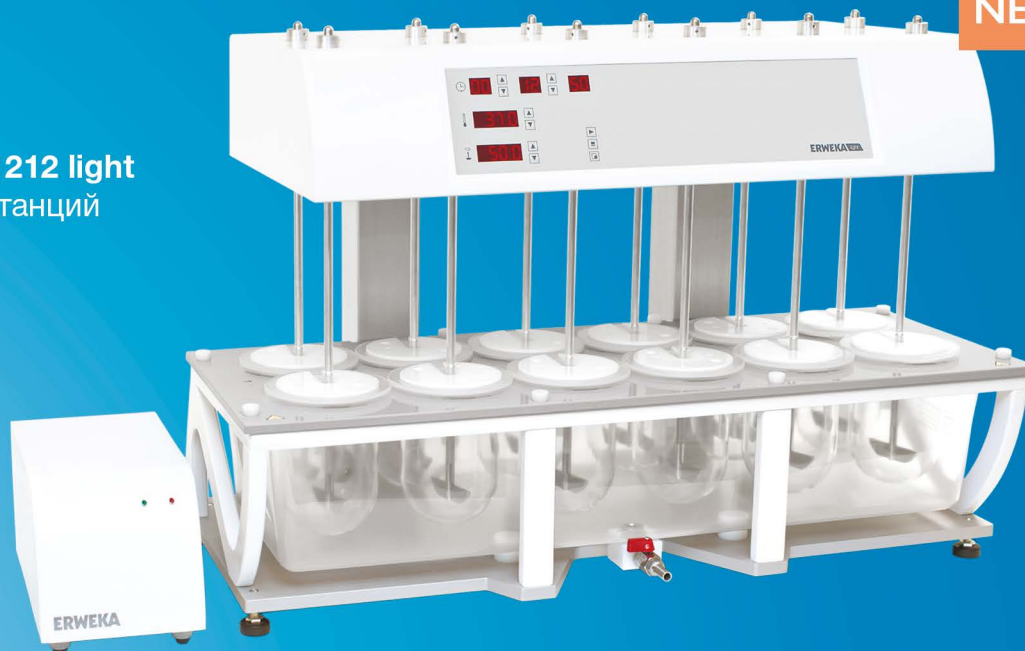


DT 128 light
8 станций



DT 126 light
6 станций

DT 1212 light
12 станций



Оригинальная статья/Research article

Исследование высвобождения лерканидипина из двухкомпонентного лекарственного препарата в комбинации с рамиприлом *in vitro* и *in vivo*

А. А. Шадрин^{1*}, Д. Ю. Ивкин¹, Е. В. Флисюк¹, И. Е. Смехова¹, Г. А. Плиско¹, А. А. Карпов²,
Е. Д. Семивеличенко¹

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, лит. А
2 – ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

*Контактное лицо: Шадрин Алексей А. E-mail: aleksey.shadrin@pharminnotech.com

Статья получена: 19.03.2019. Статья принята к печати: 07.06.2019

Резюме

Введение. Артериальная гипертензия является наиболее распространенным неинфекционным заболеванием в мире. Новые клинические рекомендации по диагностике и ведению пациентов с артериальной гипертензией рассматривают вопрос назначения комбинированной терапии и отдают предпочтение фиксированным комбинациям препаратов в одной таблетке. Изучение фармакокинетики лекарственных веществ и учет их фармакокинетических параметров на сегодняшний день является необходимым этапом в комплексе работ, как при создании новых оригинальных лекарственных средств, так и при применении известных дженерических препаратов, и связано это прежде всего с получением объективных характеристик всех процессов, которые происходят в организме животного (человека) с препаратом. Фармакокинетику оценивают в отдельных исследованиях или как часть исследований эффективности, безопасности и переносимости.

Цель. Исследование высвобождения лерканидипина из двухслойных таблеток, содержащих две фармацевтические субстанции (рамиприл и лерканидипин), в среде растворения, используемой для контроля качества *in vitro* и высвобождения *in vivo*, при пероральном введении препарата кроликам.

Материалы и методы. Проведены исследования по высвобождению лерканидипина из комбинированного лекарственного препарата *in vitro* и *in vivo*. В качестве тест-системы были использованы лабораторные кролики породы советская шиншилла. Определены фармакокинетические параметры.

Результаты и обсуждение. Построен график высвобождения лерканидипина из комбинированного лекарственного препарата и выявлена зависимость концентрации данного вещества в плазме крови кроликов от времени. Рассчитаны фармакокинетические параметры. Исследование высвобождения *in vivo* показывает, что фармакокинетика лерканидипина соответствует данным литературы.

Заключение. Испытуемый препарат обладает всеми достоинствами рациональной фиксированной комбинации антигипертензивных средств и упрощает терапию, соответствует требованиям новейших клинических рекомендаций.

Ключевые слова: лерканидипин, рамиприл, артериальная гипертензия, двухслойные таблетки, высвобождение *in vitro*, фармакокинетика.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Автор А. А. Шадрин наработал и предоставил образцы лекарственного препарата для экспериментов; провел исследование по высвобождению лерканидипина из лекарственного препарата *in vitro*. Авторы А. А. Шадрин и Е. В. Флисюк разработали дизайн эксперимента. Авторы А. А. Шадрин, Е. В. Флисюк, И. Е. Смехова, Д. Ю. Ивкин и Е. Д. Семивеличенко обрабатывали полученные в ходе эксперимента данные и принимали участие в написании текста статьи. Авторы Д. Ю. Ивкин и Е. Д. Семивеличенко провели биологическую часть эксперимента. Автор Г. А. Плиско провел анализ биологических проб. Автор А. А. Карпов провел рентгенографию кроликов.

Для цитирования: Шадрин А. А., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Плиско Г. А., Карпов А. А., Семивеличенко Е. Д. Исследование высвобождения лерканидипина из двухкомпонентного лекарственного препарата в комбинации с рамиприлом *in vitro* и *in vivo*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 14–20.

Study of Lercanidipine Drug Release from Medicine in Combination with Ramipril *in vitro* and *in vivo*

Aleksey A. Shadrin^{1*}, Dmitriy Y. Ivkin¹, Elena V. Flisyuk¹, Irina E. Smekhova¹, Grigoriy A. Plisko¹,
Andrey A. Karpov², Evgeniy D. Semivelichenko¹

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

2 – Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6-8, L'va Tolstogo str., Saint-Petersbourg, 197022, Russia

*Corresponding author: Aleksey A. Shadrin. E-mail: aleksey.shadrin@pharminnotech.com

Received: 19.03.2019. Accepted: 07.06.2019

Abstract

Introduction. Hypertension is the most common non-infectious disease in the world. New clinical recommendations for the diagnosis and management of patients with arterial hypertension are considering the issue of prescribing combination therapy and prefer fixed combinations of drugs in a single pill. The study of the pharmacokinetics of medicinal substances and the consideration of their pharmacokinetic parameters today is a necessary step in the complex of work, both in the creation of new original medicines and in the application of known generic drugs, and this is primarily due to obtaining objective characteristics of all processes occur in the body of the animal (human) with the drug. Pharmacokinetics is assessed in individual studies or as part of efficacy, safety, and tolerability studies.

Aim. The study of the release of lercanidipine from bilayer tablets containing two API (ramipril and lercanidipine) in the dissolution medium used for quality control *in vitro* and release *in vivo*, after oral administration of the drug to rabbits.

Materials and methods. Studies have been conducted on the release of lercanidipine from the combined drug *in vitro* and *in vivo*. As a test system were used laboratory rabbits Soviet chinchilla breed. Pharmacokinetic parameters were determined.

Results and discussion. A graph of the release of lercanidipine from the combined drug was constructed and the dependence of the concentration of this substance in the blood plasma of rabbits on time was revealed. Calculated pharmacokinetic parameters. An *in vivo* release study shows that the pharmacokinetics of lercanidipine are consistent with literature data.

Conclusion. The test drug has all the advantages of a rational fixed combination of antihypertensive drugs and simplifies therapy, meets the requirements of the latest clinical guidelines.

© Шадрин А. А., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., Плиско Г. А., Карпов А. А., Семивеличенко Е. Д., 2019

© Shadrin A. A., Ivkin D. Y., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Plisko G. A., Karpov A. A., Semivelichenko E. D., 2019

Keywords: lercanidipine, ramipril, arterial hypertension, bi-layer tablets, dissolution *in vitro*, pharmacokinetics.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The author Aleksey A. Shadrin produced and provided drug samples for experiments; did the study of the release of lercanidipine from the drug *in vitro*. The authors Aleksey A. Shadrin and Elena V. Flisyuk developed the design of the experiment. The authors Aleksey A. Shadrin, Elena V. Flisyuk, Irina E. Smekhova, Dmitriy Y. Ivkin and Evgeniy D. Semivelichenko did experimental data processing and participated in the writing of the text of the article. The authors Dmitriy Y. Ivkin and Evgeniy D. Semivelichenko did the biological part of the experiment. The author Grigoriy A. Plisko did the analysis of the biological samples. The author Andrey A. Karpov made a radiography of rabbits.

For citation: Shadrin A. A., Ivkin D. Y., Flisyuk E. V., Smekhova I. E., Plisko G. A., Karpov A. A., Semivelichenko E. D. Study of lercanidipine drug release from medicine in combination with ramipril *in vitro* and *in vivo*. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 14–20.

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия (АГ) является наиболее распространенным неинфекционным заболеванием в мире и основной причиной для критических поражений сердечно-сосудистой системы, почек и головного мозга, в связи с чем, ВОЗ определяет борьбу с этим состоянием одним из приоритетных направлений, имеющих целью снижение глобальной заболеваемости и смертности [1]. Новые клинические рекомендации ESH/ESC (European Society of Hypertension/European Society of Cardiology) по диагностике и ведению пациентов с АГ рассматривают вопрос назначения комбинированной терапии и отдают предпочтение фиксированным комбинациям препаратов в 1 таблетке (single-pill therapy), за исключением пациентов низкого риска и пожилых астенизированных лиц («хрупкие» пациенты), которым рекомендована монотерапия. В этом свете задача создания эффективных и безопасных комбинаций, удобных для применения, становится чрезвычайно актуальной.

Абсорбция фармацевтической субстанции (ФС) из твердой дозированной формы при пероральном введении зависит от ее высвобождения из лекарственного препарата (ЛП), растворения или солиubilизации в физиологических условиях и проницаемости в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Вследствие критического характера первых двух из этих ступеней, растворение *in vitro* может быть использовано для предсказания поведения ФС *in vivo* [2].

Изучение фармакокинетики лекарственных веществ и учет их фармакокинетических параметров на сегодняшний день является необходимым этапом в комплексе работ, как при создании новых оригинальных лекарственных средств, так и при применении известных дженерических препаратов, и связано это прежде всего с получением объективных характеристик всех процессов, которые происходят в организме животного (человека) с препаратом, начиная с всасывания из места введения и заканчивая его выведением из организма. Изучение абсорбции, распределения, метаболизма и выведения лекарственного средства продолжается на протяжении всего процесса разработки. Фармакокинетику оценивают в отдельных исследованиях или как часть исследований эффективности, безопасности и переносимости [3].

Целью работы являлось исследование высвобождения лерканидипина из двухслойных таблеток, содержащих две ФС (рамиприл и лерканидипин), в среде

растворения, используемой для контроля качества *in vitro* и высвобождения *in vivo*, при пероральном введении препарата кроликам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были использованы:

- **Реактивы**
Полисорбат 80 (Твин 80), Merck, кат. № 8.17061.
Натрия перхлорат (Натрия перхлорат 1-водный), для анализа, Panreac, Испания, кат. № 134387.
Спирт 96% (Этиловый спирт раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 96%), ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А».
Хлористоводородная кислота (Кислота соляная), ХЧ, ОАО «Каустик», Россия.
Хлорная кислота, для анализа, Panreac, Испания, кат. № A0539.
Гепарин лития, GBO, Австрия.
- **Оборудование**
Тестер растворения «Agilent 708-DS», Agilent Technologies, США.
Хроматограф жидкостный «Waters 2695», Waters, США.
рН-метр лабораторный «Seven Easy pH S20-K» в комплекте с электродами, Mettler Toledo, Китай.
Хроматограф жидкостный с масс-спектрометрическим детектором «Flexar FX15», «SQ300» PerkinElmer, США.
Центрифуга настольная Z206A, HERMLE Labor-technik, Германия.
Интродюсер Jorgen KRUUSE, Дания.
- **Стандартный образец (СО)**
Лерканидипина гидрохлорид, Molcan, кат. № LCN00H, Канада, с. 150407. Количественное содержание – 99,4%.
- **Программное обеспечение**
Empower 2 Software, Waters Corporation, базовая лицензия: em7en01652.
Microsoft Excel – PKSolver, Zhang Y1, Huo M, Zhou J, Xie S, 2010 г.
- **Исследуемый препарат**, который представлял собой двухкомпонентный ЛП на основе 5 мг рамиприла и 10 мг лерканидипина для лечения АГ в виде двухслойной таблетки, покрытой пленочной оболочкой [4], где каждая ФС находится в отдельном слое с собственными вспомогательными веществами. Таким образом, готовый продукт представляет собой две спрессованные вместе таблетки (рисунок 1), покрытые сверху пленочной оболочкой.

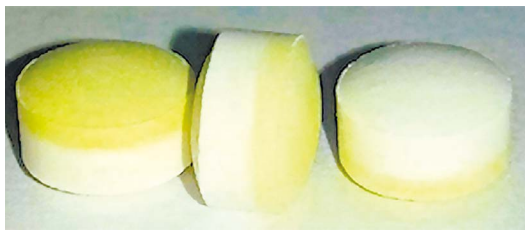


Рисунок 1. Двухслойные таблетки-ядра. Желтый цвет – слой с лерканидипином

Figure 1. Bi-layer tablet cores. The yellow color is the layer with lercanidipine

Слой с лерканидипином представляет собой полноценную двояковыпуклую таблетку диаметром 7 мм (рисунок 2).



Рисунок 2. Двухслойная таблетка в разрезе (4-х кратное увеличение)

Figure 2. Bi-layer tablet sectional (4-fold increase)

Образцы испытуемого препарата имеют эквивалентные референтным препаратам профили высвобождения действующих веществ [5].

Фармакокинетические исследования *in vivo* проводились по лерканидипину, так как рамиприл является пролекарством, что связано с определенными сложностями его ВЭЖХ-определения.

Лерканидипин – лекарственное средство для лечения АГ. Его субстанция (лерканидипина гидрохлорид) представляет собой желтый порошок, практически нерастворимый в воде и растворимый в метаноле. Относится к II классу биофармацевтической классификационной системы (БКС) [6].

- **Тест-система** по изучению фармакокинетических параметров

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные кролики породы советская шиншилла (3 самца), массой тела около 3 кг, полученные из питомника ФГУП «ПЛЖ «Рапполово». Количество животных, использованных в исследовании, было достаточно для получения статистически достоверных результатов, и при этом было минимальным по биоэтическим принципам. Лабораторные кролики являются стандартной тест-системой в опытах по изучению фармакокинетических параметров как крупные животные, негрызуны [7]. Исследования на полноценном живом организме наиболее правильно и полно отражают всю полноту взаимодействий различных типов клеток, тканей и органов в организме человека [8].

Методика проведения теста растворения

Исследование кинетики растворения проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм) и Руководству по экспертизе лекарственных средств [3].

Выбор условий для проведения теста «Растворение», которые способствуют постепенному и полному высвобождению действующих веществ из лекарственной формы, был основан на рекомендациях FDA (500 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной (HCl) – для рамиприла) и экспериментальных данных: лерканидипин обладает низкой растворимостью и плохой смачиваемостью, поэтому в среду растворения добавляли поверхностно-активное вещество (ПАВ) и увеличивали ее объем до 900 мл. Таким образом, для растворения двухкомпонентных таблеток были выбраны следующие условия: аппарат II «Лопастная мешалка» со скоростью вращения мешалки 50 об/мин; среда растворения – 0,3% раствор полисорбата 80 в 0,1 М растворе HCl, объемом 900 мл и с температурой ($37 \pm 0,5$) °C; точки отбора проб: 5 мин, 10 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин.

Приготовление растворов

Среда растворения: 3,0 г полисорбата 80 растворяли в 1000 мл 0,1 М раствора HCl.

Буферный раствор pH 3,0: 21,1 г натрия перхлората помещали в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяли в 950 мл воды, доводили pH раствора хлорной кислотой разведенной до $3,00 \pm 0,05$, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Подвижная фаза (ПФ): смешивали буферный раствор с pH 3,0 и ацетонитрил в объемном соотношении 42 : 58.

Исходный раствор СО лерканидипина гидрохлорида: около 16 мг (точная навеска) СО лерканидипина гидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляли 15 мл спирта 96%, обрабатывали на ультразвуковой бане до полного растворения, не допуская нагревания выше 25 °C, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали.

Раствор СО лерканидипина гидрохлорида: 1,0 мл исходного раствора СО лерканидипина гидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора средой растворения до метки, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр (RC) с диаметром пор 0,45 мкм.

Испытуемый раствор: в каждый сосуд для растворения помещали по 1 таблетке. Через указанные промежутки времени отбирали 10 мл раствора и фильтровали через мембранный фильтр (RC) с диаметром пор 0,45 мкм. Объем раствора восполняли средой растворения.

Количество действующего вещества, перешедшего в среду растворения, определяли методом ВЭЖХ. Колонку уравнивали подвижной фазой до достижения стабильной базовой линии. Хроматографировали раствор СО. Затем хроматографировали испытуемый раствор. Условия хроматографирования двухкомпонентных таблеток: колонка 250×4,6 мм, сорбент L1, 5 мкм; ПФ – буферный раствор pH 3,0 – ацетонитрил (42 : 58); скорость потока 0,7 мл/мин; температура колонки 40 °С; температура образцов 25 °С; детектор – УФ, 210 нм; объем вводимой пробы 50 мкл; изократический режим элюирования.

Количество лерканидипина, перешедшего в среду растворения из таблетки (X, %), вычисляли по общей формуле (1):

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot L}, \quad (1)$$

где S – площадь пика ФС на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика ФС на хроматограмме раствора СО ФС; a_0 – навеска СО ФС, в миллиграммах; P – содержание ФС в СО ФС, в процентах; L – заявленное содержание ФС в таблетке, в миллиграммах.

При построении профиля высвобождения выполнялся ряд условий: учитывалось количество принимаемых в расчет точек и значение коэффициента вариации для первой и последующих временных точек [5].

Содержание животных, введение препарата, отбор и подготовка проб для биологического этапа исследования

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (ви-вариев) (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51), Методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C., 1996) и Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также правилами, утвержденными Приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Животные в период карантина и эксперимента содержались по 1 особи в металлических клетках для кроликов типа Eurora BIOSCAPE с пластиковым поддоном (ZOONLAB, Германия) (размер пола клетки 73×73 см, высота отсека 52 см). Данные условия содержания соответствуют требованиям Директивы 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных (площадь пола клетки не менее 4200 см² и высота не менее 45 см для кроликов массой от 3 до 5 кг).

Клетки оборудованы кормушками из нержавеющей стали, пластиковыми поилками и держателями этикеток. Подстил не использовался.

Кролики содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 17–23 °С и относительной влажности 30–70%. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температура и влажность постоянно контролировались с помощью термогигрометров Testo 608-1Н.

Животные получали стандартный гранулированный корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных кроликов и морских свинок» К-122, производства ООО «ЛАБОРАТОРКОРМ», Россия ad libitum в кормушку клетки (с лишением накануне введения препарата). Животным давалась вода, соответствующая СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения», приготовленная методом фильтрации водопроводной воды через систему фильтров Аквафор. Питьевая вода давалась ad libitum в стандартных питьевых бутылочках с полной заменой воды 3 раза в неделю. Образцы воды были проанализированы на микробиологическое загрязнение и химические элементы. Анализ проводился в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» с периодичностью 1 раз в квартал.

Период адаптации животных составил 5 дней до начала введения. Во время этого периода осуществлялся ежедневный ветеринарный осмотр и визуальный контроль потребления корма и воды. Животных с отклонениями в период карантина зарегистрировано не было. Перед началом исследования все животные, прошедшие адаптацию, были включены в эксперимент, отклонение массы тела животных от среднего значения допускалось не более чем на 10%. Идентификационный номер был нанесен специальным нетоксичным маркером на внутреннюю поверхность уха животного. Каждая клетка была идентифицирована карточкой, содержащей следующую информацию: название исследования, номер исследуемой группы, пол и количество животных в клетке, а также индивидуальный номер животного.

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

Пероральное введение двухслойной таблетки проводили при помощи интродьюсера. Диаметр таблетки составляет 7 мм, поэтому она вводилась целиком, без предварительного измельчения. Таблетку фиксировали в резиновом наконечнике, открывали рот кролика и помещали туда наконечник таблеткодавателя с ЛП на корень языка, надавливали на поршень и выталкивали таблетку, вынимали инструмент и закрывали рот животному, стимулируя сглатывание (рисунки 3).



Рисунок 3. Введение таблетки кролику: А – помещение таблетки в интродьюсер; В – введение таблетки; С – конечный результат

Figure 3. Introduction of the tablet to the rabbit: А – placing the tablet into the introducer; В – the introduction of the tablet; С – final result

Отбор образцов крови у кроликов проводили из краевой вены уха с помощью катетеров-бабочек с иглой размера 23G и вакуумных пробирок Vacuette с лития гепарином (GBO, Австрия), в объеме 1 мл в соответствии с графиком пробоотбора, представленным в таблице 1. Немедленно после отбора образцы крови центрифугировались. Для увеличения объема плазмы и более полного удаления форменных элементов крови центрифугирование проводилось в два этапа: на первом этапе: скорость – 1000 об/мин, время – 5 минут, $T = 15^\circ\text{C}$; на втором этапе: скорость – 3000 об/мин, время – 10 минут, $T = 15^\circ\text{C}$.

После центрифугирования плазму отбирали механическим дозатором в пробирки типа эппендорф объемом 2 мл и замораживали при температуре -40°C . Срок хранения образцов плазмы в замороженном состоянии не превышал 14 суток.

Таблица 1. График отбора проб

Table 1. Sampling schedule

Временная точка, ч	Доза 10 мг
0	•
0,083	•
0,25	•
0,5	•
0,75	•
1	•
1,5	•
2	•
3	•
4	•
5	•
6	•
7	•
8	•
10	•
12	•
24	•
36	•

Образцы плазмы крови размораживали в термостате при температуре $+37^\circ\text{C}$. После размораживания каждый образец в объеме 0,5 мл переносили в пробирку из боросиликатного стекла, для извлече-

ния вещества добавляли 0,2% раствор HCl и ацетонитрил для осаждения белков (по 100–200 мкл) до конечного объема в 3 мл при постоянном встряхивании. Затем пробирки центрифугировали 15 мин со скоростью 8000 об/мин при температуре $+15^\circ\text{C}$. Надосадочную жидкость из каждой пробы количественно переносили в мерную колбу объемом 5 мл и доводили до метки ацетонитрилом, после чего экстракт переливали в пластиковую пробирку с плотно закручивающейся крышкой. Полученные экстракты фильтровали, отфильтрованную фракцию помещали в хроматографическую вials и анализировали на жидкостном хроматографе (Flexar FX15 (Perkin Elmer) с масс-спектрометрическим детектором SQ 300, США). Для оценки содержания лерканидипина HCl использовали колонку Kromasil 60-5 CN (150×4,0 мм, 5,0 мкм). Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и 25 мм буфера дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) ($\text{pH } 3,5 \pm 0,2$) с объемным соотношением 65 : 35 при скорости потока 1,0 мл/мин. Детектор был установлен на 242 нм и объем впрыска составлял 20 мкл. Калибровочная кривая была построена для концентраций в диапазоне от 0,5 до 25,0 мкг/мл.

Разведение ацетонитрильного экстракта учитывали при конечном расчете концентрации вещества в плазме.

Для описания фармакокинетики лерканидипина в плазме крови определяли следующие показатели:

- AUC_{0-36} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» в интервале от 0–36 часов ($\text{нг} \cdot \text{ч}/\text{мл}$);
- $\text{AUC}_{0-\infty}$ – полная площадь под кривой ($\text{нг} \cdot \text{ч}/\text{мл}$);
- MRT – среднее время пребывания препарата в организме (ч);
- $T_{1/2}$ – период полувыведения препарата (ч);
- T_{max} – время установления максимальной концентрации (ч);
- C_{max} – величина максимальной концентрации ($\text{нг}/\text{мл}$).

Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью пользовательского приложения-макроса к программе Microsoft Excel – PKSolver (ver. 2.0, Zhang Yong, China) [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование *in vitro*

В таблице 2 и на рисунке 4 приведены результаты высвобождения лерканидипина из двухслойной таблетки.

Таблица 2. Количество лерканидипина перешедшего в раствор с течением времени из двухслойных таблеток

Table 2. The quantity of lercanidipine transferred into the solution from the bi-layer tablets in process of time

Время, мин	5	10	15	30	45
Количество лерканидипина перешедшего в раствор, %	29,22	62,40	83,66	95,04	96,37
RSD, %	3,15	2,83	1,90	2,48	2,66

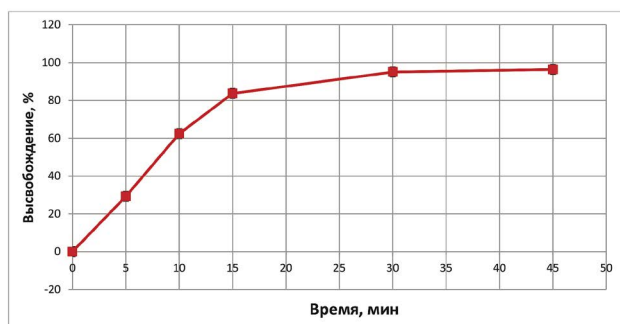


Рисунок 4. Профиль высвобождения лерканидипина из двухслойных таблеток

Figure 4. Profile release of lercanidipine from bi-layer tablets

Биологическая часть

После введения таблеток животным была проведена рентгенография для определения момента разрушения (распадаемости) исследуемого образца. Однако в связи с отсутствием в составе контрастных веществ, добавление которых изменило бы параметры всасывания ЛП, на рентгене таблетка не была обнаружена (рисунок 5).

Согласно данным литературы [10] при приеме лерканидипина человеком максимальная концентрация достигается через 1,5–3 ч, а выведение из организма



Рисунок 5. Рентгеновские снимки кроликов после перорального введения исследуемых таблеток

Figure 5. X-ray images of rabbits after oral administration of the test tablets

происходит за две фазы: через 2–5 ч (ранняя) и 8–10 ч (конечная). В данном исследовании аналогично прослеживаются две фазы выделения: на графике (рисунок 6) это отражено резкими спадами концентрации в плазме во временных точках 2–3,5 ч и 5–6 ч, а также в точке 11 ч достижения половинной концентрации (т. е. полувыведения препарата из организма).

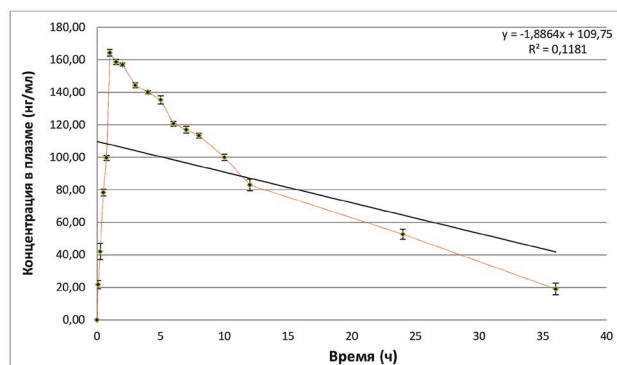


Рисунок 6. Зависимость концентрации вещества в плазме от времени

Figure 6. Dependence of substance concentration in plasma on time

Абсолютные расчетные значения фармакокинетических параметров приведены в таблице 3.

Согласно графику высвобождения лерканидипина из двухслойной таблетки *in vitro* и графику его высвобождения *in vivo*, концентрация в модельной среде растворения сопоставима с концентрацией в плазме крови животного. Однако несмотря на это, оба метода являются взаимодополняющими, а не взаимозаменяемыми.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры

Table 3. Pharmacokinetic parameters

Параметр, ед. измерения	Значения
AUC_{0-4} , нг · ч/мл	2669,01
$AUC_{0-\infty}$, нг · ч/мл	2992,92
MRT, ч	16,86
$T_{1/2}$, ч	11,82
T_{max} , ч	1,00
C_{max} , нг/мл	164,33

Исследование высвобождения *in vivo* показывает, что фармакокинетика лерканидипина соответствует данным литературы.

К негативным эффектам лерканидипина, как представителя группы блокаторов кальциевых каналов дигидропиридинового ряда (БККдгп), можно отнести развитие отеков, компенсаторное увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС), усиление симпатических влияний. Эти побочные эффекты нивелируются рамиприлом, который, как ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), снижает отечность, стабилизирует ЧСС и ослабляет симпатическое влияние. Таким образом, комбинация леркани-

дипина и рамиприла проявляет полную аддитивность эффектов, для комбинации БККдгп + иАПФ доказано снижение риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме снижения выраженности побочных класс-эффектов, входящих в состав комбинации лекарственных веществ, для комбинаций характерны также следующие достоинства:

1. Простота назначения для врача и удобство для пациента, а также простота титрования доз, что повышает комплаентность больного. Предпочтение отдается препаратам, принимаемым 1 раз в сутки (лерканидипин + рамиприл), при увеличении числа приемов комплаентность уменьшается.
2. Возможность составляющих комбинации влиять на различные звенья патогенеза, потенцирование антигипертензивных эффектов за счет сочетания препаратов с разными механизмами антигипертензивного действия (аддитивный или синергический эффект), что позволяет лучше контролировать АД у больных с недостаточным ответом на один из компонентов.
3. Исключение возможности использования нерациональных комбинаций.
4. Уменьшение стоимости лечения, учитывая тот факт, что цена комбинированных препаратов обычно меньше, чем компонентов, прописываемых по отдельности [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование по высвобождению лерканидипина из двухслойной двухкомпонентной таблетки в комбинации с рамиприлом двумя способами – аналитическим (*in vitro*) и на животных, кроликах (*in vivo*). Были рассчитаны фармакокинетические параметры лерканидипина, выявлено соответствие результатов данным литературы. Испытуемый препарат обладает всеми достоинствами рациональной фиксированной комбинации антигипертензивных средств и упрощает терапию, соответствует требованиям новейших клинических рекомендаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ионов М. В., Звартану Н. Э., Конради А. О. Совместные клинические рекомендации ESH/ESC 2018 по диагностике и ведению пациентов с артериальной гипертензией: первый взгляд. *Артериальная гипертензия*. 2018; 24(3): 351–358.
2. Смехова И. Е., Перова Ю. М., Кондратьева И. А. и др. Тест «растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013; 1(2): 50–61.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К. 2013: 328.
4. Шадрин А. А. Разработка технологии двухслойных таблеток, покрытых оболочкой, на основе фармацевтических субстанций – карбоновой кислоты и эфира карбоновой кислоты // Сборник материалов V Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург, 20–21 апреля 2015 г. – СПб.: Изд-во СПбХФА. 2015: 367–370.
5. Шадрин А. А., Флисюк Е. В., Смехова И. Е. Исследование кинетики растворения рамиприла и лерканидипина из комбинированного лекарственного препарата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 3(16): 30–34.
6. Электронная база данных BCS. Available at: <http://www.tsrlinc.net/search.cfm> (дата обращения 20.01.2019).
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред.: Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачева. М.: Профиль-2С. 2010: 358.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012: 944.
9. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comp Meth Prog Biomed*. 2010; 99(3): 306.
10. Инструкция по применению лекарственного препарата Занидип®-Рекордати. Рекордати Ирландия Лтд. Ирландия. *Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации*. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения 20.01.2019).
11. Преображенский Д. В., Стеценко Т. М., Вышинская И. Д. Фиксированные и произвольные комбинации антигипертензивных препаратов: какие более предпочтительны для длительной терапии? *Consilium Medicum*. 2009; 5: 33–37.

REFERENCES

1. Ionov M. V., Zvartan N. E., Konradi A. O. First look at new 2018 joint ESH/ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertension. *Arterial Hypertension*. 2018; 24(3): 351–358 (In Russ.).
2. Smekhova I. E., Perova Ju. M., Kondrat'eva I. A. et al. The «dissolution» test and modern approaches to the evaluation of drug equivalence (review). *Drug development & registration*. 2013; 1(2): 50–61 (In Russ.).
3. Guidelines for the examination of medicines. V. I. – M.: Grifi K. 2013: 328 (In Russ.).
4. Shadrin A. A. Development of the technology of two-layer coated tablets, based on pharmaceutical substances – carboxylic acid and carboxylic acid ester // Book of Abstracts of the V All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation «Young Pharmacy – Potential of the Future», St. Petersburg, April 20–21, 2015 – St. Petersburg: Publishing House of SPCPA. 2015: 367–370 (In Russ.).
5. Shadrin A. A., Flisyuk E. V., Smekhova I. E. Dissolution profile studies for ramipril and lercanidipine fixed-dose combination. *Drug Development & Registration*. 2016; 3(16): 30–34 (In Russ.).
6. BCS electronic database. Available at: <http://www.tsrlinc.net/search.cfm> (accessed 20.01.2019) (In Russ.).
7. Guidelines for the laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Edited by N. N. Karkishchenko and S. V. Grachev. M.: Profil-2S. 2010: 358 (In Russ.).
8. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. M.: Grif and K., 2012: 944 (In Russ.).
9. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comp Meth Prog Biomed*. 2010; 99(3): 306.
10. Medication package insert of the drug ZaniDip®-Recordati, Recordati Ireland Ltd., Ireland. *State Register of Medicinal Products of the Russian Federation*. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru> (accessed 20.01.2019) (In Russ.).
11. Preobrazhenskij D. V., Stecenko T. M., Vyshinskaja I. D. Fixed and random combinations of antihypertensive drugs: which are more preferable for long-term therapy? *Consilium Medicum*. 2009; 5: 33–37 (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-21-28>
УДК 615.322:582.628.2



Обзорная статья/Review article

Актуальные аспекты медицинского применения ореха черного – *Juglans nigra* L. (обзор)

А. В. Корочинский¹, Ж. В. Дайронас^{2*}, В. В. Верниковский², И. Н. Зилфикаров^{3,4},
Э. Ф. Степанова², М. В. Черников²

1 – ООО «Витаукт-пром», 385774, Республика Адыгея, Майкопский район, ст. Абадзехская, ул. Клубная, д. 59А

2 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

3 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР)», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

4 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», 385000, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Первомайская, д. 191

*Контактное лицо: Дайронас Жанна Владимировна. E-mail: daironas@mail.ru

Статья получена: 04.07.2019. Статья принята к печати: 16.08.2019

Резюме

Введение. Орех черный (*Juglans nigra* L.) – вид деревьев из рода орех (*Juglans*) семейства ореховые (*Juglandaceae*), естественный ареал обитания которого – Северная Америка (США и Канада). Лекарственные препараты из растений рода орех представлены на российском фармацевтическом рынке крайне ограниченно. В Государственный реестр лекарственных средств входит экстракт незрелых плодов родственного вида – ореха грецкого (*Juglans regia* L.) «Югланекс» (производство России) и комплексный препарат «Тонзилгон» (производство Германии). В реестр Роспотребнадзора включен ряд биологически активных добавок к пище из сырья ореха черного, являющихся дополнительным источником фенольных соединений (дубильных веществ и флавоноидов). Цель работы – изучение и систематизация современных сведений по химическому составу лекарственного растительного сырья ореха черного и фармакологическим свойствам его основных биологически активных соединений.

Текст. В этномедицине коренного населения Северной Америки все части ореха черного используются аналогично ореху грецкому в Азии и ореху маньчжурскому на Дальнем Востоке – для лечения укусов змей, лихорадки, расстройства желудочно-кишечного тракта.

Химический состав лекарственного растительного сырья ореха черного в качественном отношении схож с орехом грецким. Плоды, кора и листья ореха черного содержат богатый полифенольный комплекс (нафтохиноны, в частности юглон и его производные, дубильные вещества, флавоноиды, фенолокислоты), витамины, эфирное масло, органические кислоты. Однако в сырье ореха черного содержание биологически активных веществ более высокое, особенно в отношении полифенольных соединений.

В научной литературе описаны результаты экспериментов на животных, подтверждающие антиоксидантное, антимикробное, противогрибковое, противовирусное, антипаразитарное, гипогликемическое, спазмолитическое, а также противоопухолевое в отношении некоторых клеточных линий действие.

Заключение. В результате изучения литературы и систематизации современных сведений по химическому составу лекарственного растительного сырья ореха черного и фармакологическим свойствам его основных биологически активных соединений установлено, что фармакологические свойства связаны с наличием фенольного комплекса, однако требуется более глубокое изучение химического состава. В доклинических испытаниях суммарные извлечения из лекарственного растительного сырья ореха черного и выделенные индивидуальные соединения проявляют преимущественно антимикробное, противогрибковое, антиоксидантное, противовирусное, гипотензивное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и спазмолитическое действие.

Ключевые слова: орех черный, *Juglans nigra*, *Juglandaceae*, фармакологическая активность, фенольные соединения, нафтохиноны, юглон.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Благодарность. Авторы выражают благодарность генеральному директору ООО «Витаукт-пром» А. Г. Гарбузову за финансовую поддержку работы.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в сборе информации, её анализе, обсуждении и написании текста статьи.

Для цитирования: Корочинский А. В., Дайронас Ж. В., Верниковский В. В., Зилфикаров И. Н., Степанова Э. Ф., Черников М. В. Актуальные аспекты медицинского применения ореха черного – *Juglans nigra* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 21–28.

Actual Aspects of Medical Application of Black Nut – *Juglans Nigra* L. (Review)

Alexey V. Korochinsky¹, Janna V. Daironas^{2*}, Vladislav V. Vernikovskiy², Ifrat N. Zilfikarov^{3,4},
Eleonora F. Stepanova², Maxim V. Chernikov²

1 – LLC «Vitaukt-prom», 59A, st. Klubnaya, Abadzekhsкая, 385774, Republic of Adygea, Russia

2 – Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia, 11, Kalinin av., Pyatigorsk, Stavropol region, 357532, Russia

3 – All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7, Grin str., Moscow, 117216, Russia

4 – Maikop State Technological University, 191, Pervomayskaya str., Maykop, 385000, Republic of Adygea

*Corresponding author: Janna V. Daironas. E-mail: daironas@mail.ru

Received: 04.07.2019. Accepted: 16.08.2019

Abstract

Introduction. Herbal drugs of black walnut (*Juglans nigra* L.) are not registered on the territory of the Russian Federation at the present time. However, the State Register of Medicinal Products includes an extract of unripe fruits of a related species walnut (*Juglans regia* L.) «Yuglanex» (made in Russia) and the complex herbal drug «Tonsilgon» (made in Germany). A number of biologically active food supplements from black walnut raw materials have been registered by Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. They are an additional source of phenolic compounds as tannins and flavonoids. The purpose of the article is to study and systematize up-to-date information on the chemical composition of the medicinal plant raw material of black walnut and the pharmacological properties of its main biologically active compounds.

© Корочинский А. В., Дайронас Ж. В., Верниковский В. В., Зилфикаров И. Н., Степанова Э. Ф., Черников М. В., 2019
© Korochinsky A. V., Daironas J. V., Vernikovskiy V. V., Zilfikarov I. N., Stepanova E. F., Chernikov M. V., 2019

Text. All parts of the black walnut are used in the ethnomedicine of the indigenous population of North America according to indications similar to the walnut in Asia and the Manchurian nut in the Far East: snake bites, fever and disorders of the gastrointestinal tract.

The chemical composition of the medicinal plant raw material of black walnut is decently walnut by its qualitative composition. Fruits, bark and leaves of black walnut contain a rich polyphenol complex (naphthoquinones, in particular, juglon and its derivatives, tannins, flavonoids, phenolic acids), vitamins, essential oil, organic acids. However, the quantitative analysis revealed a higher content of biologically active substances in the raw black walnut, especially in relation to polyphenolic compounds.

The scientific literature describes the results of experiments on animals, confirming antioxidant, antimicrobial, antifungal, antiviral, antiparasitic, hypoglycemic, antispasmodic, and anti-tumor effect on certain cell lines.

Conclusion. As a result of studying the literature and systematizing the current information on the chemical composition of the medicinal plant raw material of the black nut and the pharmacological properties of its main biologically active compounds, it has been established that the main properties are related to the presence of the phenol complex. However, a deeper study of the chemical composition is required. Both the total extracts of the black walnut from plant raw materials and individual compounds show predominantly antimicrobial, antifungal, antioxidant, antiviral, hypotensive, immunomodulatory, antitumor and antispasmodic activities in preclinical trials.

Keywords: black walnut, *Juglans nigra*, medicinal plants, Juglandaceae, pharmacological activity, phenolic compounds, pharmacognosy.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Acknowledgment. The authors are grateful to the General Director of LLC «Vitaukt-prom» A. G. Garbuzov for financial support this work.

Contribution of the authors. All authors participated in the collection of information, its analysis, discussion and writing the text of the article.

For citation: Korochinsky A. V., Daironas J. V., Vernikovskiy V. V., Zilfikarov I. N., Stepanova E. F., Chernikov M. V. Actual aspects of medical application of black nut – *Juglans nigra* L. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 21–28.

ВВЕДЕНИЕ

Орех черный (*Juglans nigra* L.) – вид деревьев из рода орех (*Juglans*) семейства ореховые (*Juglandaceae*), естественный ареал обитания которого – Северная Америка (США и Канада) [1]. В Европе и на юге Европейской части России (Краснодарский край и Республика Адыгея) выращивается как декоративная культура, имеющая в т.ч. хозяйственное значение [2]. Плоды ореха черного напоминают плоды ореха грецкого (*J. regia* L.), но более вытянутые, слегка опушенные и заостренные на конце. Ядра съедобны, содержат до 50% жирного масла. Плоды, зрелые и незрелые, а также листья представляют интерес для медицинского применения, так как содержат значительное количество фенольных соединений, в частности, нафтохинонов юглона и его производных.

Лекарственные препараты из растений рода орех представлены на российском фармацевтическом рынке крайне ограниченно. В Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации включены два наименования, полученные из лекарственного растительного сырья (ЛРС) ореха грецкого: жидкий экстракт из плодов молочной спелости «Югланэкс» и «Тонзилгон» – комплексный жидкий экстракт, в состав которого входит сумма экстрактивных веществ из листьев ореха. «Югланэкс» обладает противовоспалительным и антисептическим действием, оказывает антиоксидантное, капилляроукрепляющее и венотонирующее действие и рекомендован в комплексной терапии хронической венозной недостаточности. «Тонзилгон» рекомендован при заболеваниях верхних дыхательных путей, профилактике осложнений при респираторных вирусных инфекциях [3]. Лекарственных препаратов из сырья ореха черного в настоящее время в России не зарегистрировано.

В этномедицине коренного населения Северной Америки все части ореха черного нашли применение

по показаниям, аналогичным для ореха грецкого в Азии и ореха маньчжурского на Дальнем Востоке. Отвар коры ореха черного у североамериканских индейцев (чероки, делавары, ирокезы и мескиаки) упоминается как болеутоляющее, рвотное средство, которое также применяли местно при зубной и головной боли, укусах змей. Команчи использовали порошок листьев ореха черного для лечения стригущего лишая, а делавары – листья как инсектицид для отпугивания блох. Ядра ореха съедобны, поэтому коренные народы Северной Америки употребляют их в пищу [1]. Различные части ореха черного в той или иной форме использовали для облегчения симптомов лихорадки, лечения заболеваний почек, желудочно-кишечных расстройств, язв, зубной боли, сифилиса и укусов змей, как противоглистное средство [4].

В Российской Федерации зарегистрирован ряд биологически активных добавок (БАД) к пище, полученные из сырья ореха черного (таблица 1) [5, 6].

В России также запатентован способ получения настойки из плодов ореха черного [7].

Несмотря на достаточно широкий ассортимент производимой продукции, характеристика ее химического состава, как правило, сводится к оценке на наличие полифенольных соединений, преимущественно дубильных веществ, что, на наш взгляд, значительно сужает спектр возможного медицинского применения сырья и фитопрепаратов ореха черного. Поэтому целью настоящей работы является систематизация современных сведений научной литературы, посвященной химическому составу сырья ореха черного и фармакологическим свойствам его основных биологически активных соединений.

Химический состав сырья ореха черного представлен различными группами биологически активных соединений (таблица 2).

Таблица 1. Перечень БАД, разработанных из сырья ореха черного

Table 1. The list of dietary supplements developed from raw materials of black walnut

Наименование	Форма выпуска	Назначение	Производитель
«Юглон (Juglon)»	жидкость во флаконах от 50 мл до 500 мл	источник дубильных веществ, флавоноидов	ООО «Витаукт-пром» (Российская Федерация)
«Черный орех NOW» («Black Walnut Hulls»)	капсулы массой 605 мг	источник полифенольных соединений	«NOW International» (США)
«Листья черного ореха» («Black Walnut Leaves»)	таблетки массой 850 мг	источник флавоноидов, полифенольных соединений, дополнительного источника кальция	«RBC Life Sciences, Inc.» (США)
«Грецкий черный орех» («Black Walnut»)	капсулы по 520,0 мг	источник флавоноидов, дубильных веществ	«Nature's Sunshine Products, Inc.» (США)
«Формула Здоровья. Черный орех» («Black Walnut»)	капсулы массой 590 мг	источник флавоноидов и дубильных веществ (танина)	«Archon Vitamin Corporation» (США)
«Экстракт черного ореха» («Black Walnut Extract»)	по 60 мл во флаконах с капельницей	источник дубильных веществ	«Nittany Pharmaceuticals Inc.» (США)
«Экстракт черного ореха» («Black Walnut Extract»)	по 60 мл во флаконах с капельницей	источник полифенольных соединений	«Hi-Tech Nutraceuticals, LLC» (США)
«Блэк Валнут Холлз» («Black Walnut Hulls»)	капсулы массой 615 мг	источник танинов	«NutriCare International, Inc.» (США)
«Программа 2 Коло-Вада Плюс» комплект 1», «Программа 2 Коло-Вада Плюс» комплект 2» (Program 2 Colo-Vada Plus packet 1, packet 2) – в их составе «Листья черного ореха» («Black Walnut Leaves»)	таблетки массой 850 мг	источник флавоноидов, антрахинонов, полифенольных соединений (галловой кислоты), дополнительного источника витаминов А, С, Е, D ₃ , В ₁ , В ₂ , В ₆ , В ₁₂ , никотинамида, фолиевой кислоты, биотина, пантотеновой кислоты, железа, йода, кальция, селена, магния, цинка, меди, хрома, молибдена, марганца	«RBC Life Sciences, Inc.» (США)
«Корал Черный орех» (Coral Black Walnut)	капсулы массой 570,0±28,5 мг	источник полифенольных соединений и флавоноидов	«Bio International, Inc.» (США)

Таблица 2. Химический состав ореха черного [8–15]

Table 2. The chemical composition of the black walnut [8–15]

Биологически активные соединения	Лекарственное растительное сырье		
	Кора	Листья	Плоды
Алкалоиды	Югландин	Югландин	Алкалоиды
Белки	–	–	Пищевой аллерген, относящийся к глобулиновым белкам
Витамины	–	С, каротиноиды, В ₁ , В ₆ , Р, Е, РР	Околоплодник – витамин С, каротиноиды
Дубильные вещества	Дубильные вещества	Дубильные вещества	Дубильные вещества
Жирное масло	–	–	Жирное масло
Нафтохиноны	Юглон, гидроюглон	Юглон, гидроюглон	Юглон, гидроюглон
Тритерпены	Тритерпены	–	–
Макро- и микроэлементы	–	Алюминий, барий, бор, ванадий, галлий, железо, калий, кальций, кремний, литий, магний, марганец, медь, молибден, натрий, никель, свинец, серебро, стронций, титан, фосфор, хром, цинк, цирконий	Макро- и микроэлементы
Кумарины	–	Умбеллиферон	Кумарины
Органические кислоты	–	Органические кислоты	Органические кислоты
Флавоноиды	–	Кверцитрин, астрагалин, 3,5,7,3',4'-пента-оксифлаво-3-β-L-рамнофуранозид, 3,5,7,4'-тетраокси-флаво-3-α-D-глюко-пиранозид, 7,3',4',5'-гексаокси-флаво-3-α-L-рамнопиранозид, мирицитрин	Лютеолин
Полисахариды	–	Полисахариды	Полисахариды
Сапонины	–	Сапонины	Сапонины
Фенолкарбоновые кислоты	–	Гентизиновая и вератровая кислоты	Галловая, эллаговая кислоты
Эфирное масло	–	С преобладанием сесквитерпенов и ароматических соединений. Доминирующие компоненты β-кариофиллен, гермакрен D, апинен	–

Примечание: «–» – сведения не найдены.

Note: «–» – information not found.

ЛРС, заготовленное от ореха черного, характеризуется более высоким содержанием суммы дубильных веществ в пересчете на танин и суммы нафтохинонов в пересчете на юглон, чем ЛРС, заготовленное от других видов рода *Juglans* – ореха грецкого (*J. regia* L.) и ореха серого (*J. cinerea* L.) (таблица 3) [10].

Таблица 3. Содержание фенольных соединений в ЛРС видов рода ореха

Table 3. The content of phenolic compounds in the raw materials of the nut genus

Вид	Лекарственное растительное сырье			
	кора	листья	плоды высушенные	плоды свежие
Содержание суммы нафтохинонов в пересчете на юглон, %				
О. грецкий	0,038±0,002	0,083±0,002	0,028±0,001	0,0058±0,0001
О. серый	0,058±0,002	0,032±0,001	–	–
О. черный	0,11±0,005	0,24±0,009	0,19±0,008	0,069±0,003
Содержание дубильных веществ в пересчете на танин, %				
О. грецкий	4,79±0,05	2,43±0,05	3,48±0,07	2,98±0,05
О. серый	5,28±0,05	3,25±0,06	–	–
О. черный	7,39±0,07	8,67±0,20	8,75±0,18	8,21±0,10

Примечание: «–» – исследования не проводились.

Note: «–» – no studies were conducted.

Максимальное содержание суммы нафтохинонов в пересчете на юглон зафиксировано в листьях *J. nigra* (0,24±0,009%). ЛРС видов рода *Juglans* по содержанию дубильных веществ (от 2,43% в листьях ореха грецкого до 8,75% в высушенных плодах ореха черного) сопоставимо с фармакопейными видами ЛРС, характеризующимися высоким содержанием дубильных веществ [16].

В работе [17] исследовалась зависимость содержания летучих веществ в плодах ореха черного от стадии их созревания. Установлено, например, что окраска ядер плодов черного ореха зависит от времени сбора плодов и может свидетельствовать о содержании спиртов, альдегидов, эфиров, производных бензола и линейных углеводов, кетонов и фуранов. Концентрация летучих соединений значительно выше в светлых ядрах черных орехов, сорванных с веток в начале созревания, чем в образцах среднего цвета (в середине созревания); а образцы среднего цвета имели более высокое содержание летучих соединений, чем темные ядра орехов, упавших на землю в конце созревания. Присутствие алкилальдегида гексана обуславливает прогорклый и едкий запах, отличающий ядра темного цвета от светлых ядер и средне окрашенных.

Фармакологическая активность биологически активных веществ (БАВ) ореха черного изучена и описана в ряде научных публикаций. Преимущественно исследовалось действие суммарных извлечений, полученных с использованием спирта этилового различной концентрации. В некоторых работах описаны фармакологические эффекты индивидуальных соединений фенольной природы, выделенных из ЛРС ореха черного (таблица 4).

Таблица 4. Фармакологическая активность БАВ фенольной природы из ЛРС ореха черного

Table 4. The pharmacological activity of the BAS phenolic nature of the raw material of black walnut

Биологически активные вещества	Лекарственное растительное сырье	Фармакологическая активность
Дубильные вещества	Кора, листья, плоды	Антибактериальная [18], противоопухолевая [19]
Нафтохиноны (юглон и его производные)	Кора, листья, плоды	Антиоксидантная [20], антибактериальная и противогрибковая [21–24, 26–28], противовирусная [29–31], цитотоксическая [32], противоопухолевая [19, 33–38]
Флавоноиды	Листья, плоды	Кардиотоническая, спазмолитическая, гипотензивная [14], антимикробная [39]

Антибактериальное действие фенольных соединений ореха черного было установлено в отношении 7 видов микроорганизмов, с минимальной ингибирующей концентрацией в диапазоне от 125 до 500 мг/мл [18]. При использовании метода диффузии в агар была выявлена антибактериальная активность извлечений из ядер черного ореха в отношении грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*, которую связывают с содержанием кверцетин-3-О-глюкозида, кверцетина, агнузида, эриодиктиол-7-О-глюкозида, азелаиновой кислоты и глансрегинина А [39]. Антибактериальное действие препаратов ореха черного также обусловлено наличием в их составе нафтохинона юглона. Установлено, что юглон как выделенный из природного сырья, так и полученный синтетическим путем, оказывает антимикробную и противогрибковую активность [21–26, 28] (таблица 5).

Таблица 5. Антимикробная активность юглона

Table 5. Antimicrobial activity of juglon

Микроорганизм	Эффективная концентрация, мкг/мл
<i>Acetobacter aceti</i>	4
<i>Acetobacter ascendens</i>	4
<i>Acetobacter rancens</i>	4
<i>Acetobacter xylinum</i>	3
<i>Aspergillus flavus</i>	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10
<i>Aspergillus niger</i>	10
<i>Bacillus anthracis</i>	100
<i>Bacillus anthracoides</i>	100
<i>Bacillus subtilis</i>	100
<i>Candida mycoderma</i>	10
<i>Corynebacterium diptheriae</i>	100
<i>Hansenula anomala</i>	5
<i>Lactobacterium breve</i>	5
<i>Leuconostoc gracile</i>	5
<i>Lactobacterium plantarum</i>	10
<i>Sacchromyces vini</i>	5

Методом молекулярного докинга с использованием белка 1a8g (фермента, необходимого для обеспечения нормального жизненного цикла вируса имму-

нодефицита человека) была показана высокая вероятность того, что юглон является потенциальным *противовирусным средством* [31]. Исследования *in vitro* подтвердили активность в отношении вирусов иммунодефицита человека типа 1 [29] и везикулярного стоматита [30].

Кардиотоническое, спазмолитическое и гипотензивное действие суммы флавоноидов ореха черного в концентрациях от 1:10000 до 1:1000 было установлено А. Л. Шинкаренко с соавторами в эксперименте на изолированном сердце лягушки. Обнаружено, что под влиянием флавоноидов ореха черного происходит увеличение амплитуды сердечных сокращений и снижение их частоты, а также наблюдаются спазмолитический и гипотензивный эффекты [14]. Суммарные извлечения из ЛРС ореха черного также оказывают гипотензивное действие [14, 40].

Гипогликемическая активность настойки околоплодника ореха черного установлена в эксперименте на крысах [41–43].

Масляный экстракт околоплодника ореха черного проявлял выраженную *ранозаживляющую активность* [41–43].

Внимание исследователей привлекают *антиоксидантная и антигипоксанта́нная активности* БАВ из ореха черного. Так, М. Э. Дудниковым с соавторами в испытаниях *in vivo* было установлено наличие у настойки околоплодника ореха черного антигипоксанта́нной активности [41–43].

У фенольных соединений из околоплодника ореха черного установлена выраженная антиоксидантная активность на модели железовосстанавливающей способности плазмы в сравнении с тролоксом – водорастворимым аналогом токоферола [20]. Юглон усиливает антиоксидантную деятельность печени за счет стимуляции активности супероксиддисмутазы, что также способствует инактивации липоцитов и уменьшает накопление коллагена внеклеточного матрикса в печени, препятствуя развитию фиброза [44].

Этанольный экстракт из коры черного ореха показал высокую антиоксидантную активность на моделях захвата радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила, гидроксил-, супероксид- и нитрозил-радикалов [45].

Противоопухолевая активность ореха черного была предметом ряда исследований, в которых оценивалась как выраженность действия, так и его возможные механизмы. Например, действие эллаговой кислоты и юглона было исследовано на мышах в отношении опухолей грудной железы. Эллаговая кислота вводилась инъекционно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в течение 9 дней. Размер опухолей (длина, ширина и высота, мм) и вес мышей измерялись на 0, 3, 6 и 9 сутки после первой инъекции эллаговой кислоты. Юглон вводился так же в дозе 10 мг/кг, размер опухолей измерялся на 3, 6 и 9 сутки с начала эксперимента. Было установлено, что эллаговая кислота выраженно подавляла рост опухолей, однако сравнение с трансплантируемыми опухолями показало, что активность

в отношении подавления опухолевого роста в последнем случае значительно ниже. Это может быть объяснено тем, что скорость роста трансплантированных опухолей выше, чем спонтанных. Смертность мышей, получавших эллаговую кислоту, с трансплантированными опухолями (27,78%) была выше, чем у мышей со спонтанными опухолями (3,44%), получавшими это же вещество. Применение юглона значительно угнетало рост опухолей, однако смертность в этой группе животных достигала 78,95% [19].

Противоопухолевая активность нафтохинонов черного ореха заключается в цитотоксическом действии в отношении различных линий раковых клеток, обусловленном индукцией апоптоза, а также образованием свободных радикалов [46]. При исследовании действия юглона на клетки глиомы у крыс была установлена антими́то́тическая активность, а также цитотоксичность и способность индуцировать апоптоз. В основе действия, по-видимому, лежит воздействие на окислительно-восстановительные процессы [36]. Противоопухолевое действие юглона было установлено также в отношении эпителиомы [34], карциномы яичника SKOV3 [35], аденокарциномы простаты LNCaP [37], цервикальной карциномы HeLa [38] и асцитной карциномы Эрлиха [47].

Сухой экстракт, полученный водной экстракцией ядер ореха черного с последующей лиофилизацией, при пероральном введении крысам проявил выраженные гепатопротекторный и антикласто́генный эффекты на фоне токсического поражения, индуцированного введением арсенита натрия, что позволяет прогнозировать химиофилактический потенциал в отношении канцерогенеза [48].

Цитотоксичность нафтохиноновых пигментов ореха черного обусловлена двумя различными механизмами, а именно окислительно-восстановительным циклом и реакцией с глутатионом. Окислительно-восстановительный цикл приводит к образованию соответствующих семихиноновых радикалов. Инкубация кератиноцитов с хинонами приводит к образованию перекиси водорода и приводит к окислению глутатиона. Истощение глутатиона с помощью бутионинсульфоксими́на усиливает продукцию радикалов семихинона, увеличивает образование H_2O_2 и повышает цитотоксичность. Таким образом, противогрибковые, противовирусные и антибактериальные свойства нафтохинонов являются результатом окислительно-восстановительных циклов [32].

Было установлено, что водный и гексановый экстракт ореха черного потенциально способны продуцировать активные формы кислорода, которые могут вызывать повреждение тканей, прямо или косвенно. Гексановый экстракт ореха черного содержит липофильные производные нафтохинонов, взаимодействующие с липид-связывающими белками сыворотки крови, что, предположительно, облегчает продуцирование активных форм кислорода [49].

Водный экстракт ореха черного, добавленный в количествах 0,6–10% к инкубируемым моноклеарным клеткам, не вызывал потери целостности клеточных мембран, но индуцировал дозозависимое увеличение активности каспаз 3 и 7 и выработку фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) [50].

Для юглона и его производных установлено также иммуномодулирующее действие [47, 51]. Введение экстракта черного ореха вызывало увеличение CD163-позитивных макрофагов в области вторичной дермальной пластинки [52]. Экстракт ореха черного способствует активации нейтрофилов [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе изучения и анализа современных данных научных публикаций, посвященных химическому составу и фармакологическим свойствам фитопрепаратов, извлечений и индивидуальных соединений из ЛРС ореха черного, установлено, что его основные фармакологические свойства связаны с содержанием БАВ фенольной природы. В доклинических испытаниях как суммарные извлечения, так и индивидуальные соединения проявляют преимущественно антибактериальное, противогрибковое, антиоксидантное, противовирусное, гипотензивное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и спазмолитическое действие.

Направление по исследованию химического состава и фармакологической активности существующих биологически активных добавок к пище, полученных их листьев, плодов, коры ореха черного, с последующей их государственной регистрацией в качестве лекарственных средств является перспективным. Также представляет интерес разработка и совершенствование оптимальных технологий получения комплексных препаратов, содержащих широкий спектр биологически активных веществ этого сырья. Запатенована БАД к пище, представляющая собой порошок коры ореха черного [54].

ЛИТЕРАТУРА

1. Michler C. H., Woeste K. E., Pijut P. M. Black Walnut. In: Kole C. (eds) *Forest Trees. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. 2007: 7. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-540-34541-1_6.
2. Шехмирова М. Д., Тушканова О. В. Биологические особенности ореха черного в условиях республики Адыгея. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2004; 2: 80–84.
3. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации Дата актуализации базы данных – 20.05.2019. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
4. *Juglans nigra* L. – Black Walnut. Paleoethnobotany Laboratory Guide April 3, 2012.
5. Реестр свидетельств о государственной регистрации (единая форма Таможенного союза, российская часть). Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Дата актуализации базы данных 25.04.2019. Available at: <http://fp.crc.ru/evrazes/>.
6. Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Корочинский А. В. Инновационные технологии в производстве фитопрепаратов ореха черного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014; 3: 60–64.
7. Жилина И. В. Способ получения настойки черного ореха Российская Федерация патент 2383355 22.12.2008. Available at: <http://www.fips.ru>.
8. Дайронас Ж. В. Сравнительный анализ эфирного масла листьев ореха грецкого, ореха серого и ореха черного. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015; 7: 16–20.
9. Zhang Y. Z., Du W. X., Fan Y., Yi J., Lyu S. C., Nadeau K. C., Thomas A. L., McHugh T. Purification and Characterization of a Black Walnut (*Juglans nigra*) Allergen, Jug n 4. *J. Agric. Food. Chem.* 2017; 65(2): 454–462. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04387.
10. Дайронас Ж. В. Экспериментально-теоретическое исследование лекарственного растительного сырья, содержащего нафтохиноны, и его стандартизация: дис. ... докт. фармац. наук. М. 2017: 388.
11. Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н. Изучение фенольных соединений листьев ореха грецкого и ореха черного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013; 3: 57–60.
12. Бандюкова В. А. Некоторые итоги изучения химического состава растений Северного Кавказа. Фенольные соединения и их биологические функции. М. 1968: 95–100.
13. Бандюкова В. А., Аванесов Э. Т. О вероятности обнаружения некоторых агликонов в семействах высших растений. *Растительные ресурсы*. 1975; 11 (3): 334–342.
14. Шинкаренко А. Л., Соколов С. Д., Доронина В. И. Химическое и фармакологическое изучение флавоноидных комплексов из листьев грецкого и черного ореха. *Вопросы курортологии, фармакологии, фармакологии*. Пятигорск. 1967: 365–366.
15. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: часть I – Семейства *Lycopodiaceae – Ephedraceae*. Часть II – Дополнения к 1–7 томам. СПб.: *Мир и семья-95*. 1996: 571.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации: в 4 т. XIV изд. М.: 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
17. Lee J., Vázquez-Araújo L., Adhikari K., Warmund M., Elmore J. Volatile compounds in light, medium, and dark black walnut and their influence on the sensory aromatic profile. *J. Food. Sci.* 2011; 76(2): 199–204. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02014.x.
18. Amarowicz R., Dykes G. A., Pegg R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*. 2008; 79(3): 217–219. DOI: 10.1016/j.fitote.2007.11.019.
19. Bhargava U. C., Westfall B. A. Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extracts. *J Pharm Sci.* 1968; 57(10): 1674–1677.
20. Wenzel J., Storer Samaniego C., Wang L., Burrows L., Tucker E., Dwarshuis N., Ammerman M., Zand A. Antioxidant potential of *Juglans nigra*, black walnut, husks extracted using supercritical carbon dioxide with an ethanol modifier. *Food Sci. Nutr.* 2016; 5(2): 223–232. DOI: 10.1002/fsn3.385.
21. Полоник С. Г., Толкач А. М., Стехова С. И., Шенцова Е. Б., Уварова Н. И. Синтез и изучение противогрибковой активности ацетилированных гликозидов гидроксиюглонов. *Химико-фармацевтический журнал*. 1992; 26(6): 31–32.
22. Тушканова О. В., Бойко И. Е. Исследование антибиотической активности юглона, выделенного из околоплодника *Juglans nigra* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 1(18): 126–129.
23. Щербановский Л. Р., Нилов Г. И., Рабинович З. Д., Горина В. А. Растительные нафтохиноны – ингибиторы дрожжей, молочнокислых и уксуснокислых бактерий. *Растительные ресурсы*. 1972; 8(1): 112–115.
24. Щербановский Л. Р., Шубина Л. С. Бензо-, нафто- и антрахиноны цветковых растений как антимикробные вещества. *Растительные ресурсы*. 1975; 11(3): 445–454.
25. P. Abedi, M. Yaralizadeh, M. Fatahinia, F. Namjooyan, S. Nezamivand-Chegini, M. Yaralizadeh. Comparison of the Effects of *Juglans Nigra* Green Husk and Clotrimazole on *Candida Albicans* in Rats. *Jundishapur Journal of Microbiology In Press*: Published online. 2017; November 30: e58151. DOI: 10.5812/jjm.58151.
26. Якубовская А. Я., Похило Н. Д., Ануфриев В. Ф., Анисимов М. М. Синтез, антимикробная и противогрибковая активность соединений нафтазарина ряда. *Химико-фармацевтический журнал*. 2009; 43(7): 22–24.
27. Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P.-A. K. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC PRESS. 2002: 893.

28. Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25 (5): 669–670.
29. Min B. S., Nakamura N., Miyashiro H., Kim Y. H., Hattori M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2000; 48(2): 194–200.
30. Strugstad M. P., Despotovski S. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review. *Journal of Ecosystems and Management*. 2012; 13(3): 1–16.
31. Vardhini S. R. Exploring the antiviral activity of juglone by computational method. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2014; 34(6): 456–457. DOI: 10.3109/10799893.2014.917325.
32. Inbaraj J. J., Chignell C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 2004; 17(1): 55–62. DOI: 10.1021/tx034132s.
33. Полоник С. Г., Прокофьева Н. Г., Агафонова И. Г., Уварова Н. И. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность О- и S-ацетилгликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона). *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(8): 3–4.
34. Chae J. I., Cho J. H., Kim D. J., Lee K. A., Cho M. K., Nam H. S., Woo K. M., Lee S. H., Shim J. H. Phosphoinositol 3-kinase, a novel target molecule for the inhibitory effects of juglone on TPA-induced cell transformation. *Int J Mol Med.* 2012; 30(1): 8–14. DOI: 10.3892/ijmm.2012.969.
35. Fang F., Qin Y., Qi L., Fang Q., Zhao L., Chen S., Li Q., Zhang D., Wang L. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2015; 18(6): 544–548.
36. Pavan V., Ribaudo G., Zorzan M., Redaelli M., Pezzani R., Mucignat-Caretta C., Zagotto G. Antiproliferative activity of Juglone derivatives on rat glioma. *Nat. Prod. Res.* 2017; 31(6): 632–638. DOI: 10.1080/14786419.2016.1214830.
37. Xu H., Yu X., Qu S., Sui D. Juglone, isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(12): 3631–3634. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.007.
38. Zhang W., Liu A., Li Y., Zhao X., Lv S., Zhu W., Jin Y. Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(11): 1553–1558. DOI: 10.1139/y2012-134.
39. Ho K. V., Lei Z., Sumner L. W., Coggeshall M. V., Hsieh H. Y., Stewart G. C., Lin C. H. Identifying antibacterial compounds in black walnuts (*Juglans nigra*) using a metabolomics approach. *Metabolites*. 2018; 8(4): E58. DOI: 10.3390/metabo8040058.
40. Oguwike F. N., Ebede S., Offor C. C. Evaluation of Efficacy of Walnut (*Juglans Nigra*) On Blood Pressure, Haematological and Biochemical Profile of Hypertensive Subjects. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*. 2014; 13(10): 75–79.
41. Дудников М. Э. Биотехнологические исследования по безотходному использованию околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.): дисс. ... канд. биол. наук. Ставрополь. 2006: 120.
42. Дудников М. Э., Андреева И. Н., Арчинова Т. Ю. Разработка малоотходной технологической схемы переработки околоплодника ореха черного для получения лекарственных и косметических средств. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции*. Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2004; 59: 81–82.
43. Дудников М. Э., Андреева И. Н., Арчинова Т. Ю. Сравнительные исследования суммарных фитопрепаратов, полученных из околоплодника некоторых разновидностей орехов. *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции*. Пятигорск: Пятигорская ГФА. 2003; 58: 203–204.
44. Zhou D. J., Mu D., Jiang M. D., Zheng S. M., Zhang Y., He S., Weng M., Zeng W. Z. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of α SMA and collagen III. *Mol. Med. Rep.* 2015; 12 (3): 4095–4102. DOI: 10.3892/mmr.2015.3992.
45. Pozdnyakov D. I., Adzhiahmetova S. L., Chervonnaya N. M., Zolotych D. S., Dajronas Z. V., Vernikovskij V. V., Kharchenko I. I., Pozdnyakova A. E., Lyakhova N. S. Antioxidant activity of the extracts of plants of the flora of the North Caucasus. *Int. J. Adv. Res.* 2018; 6(12): 1034–1042. DOI: 10.21474/IJAR01/8232.
46. Montoya J., Varela-Ramirez A., Estrada A., Martinez L. E., Garza K., Aguileria R. J. A fluorescence-based rapid screening assay for cytotoxic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 325(4): 1517–1523. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.10.196.
47. Полоник С. Г., Прокофьева Н. Г., Агафонова И. Г., Уварова, Н. И. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность О- и S-ацетилгликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона). *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(8): 3–4.
48. Owumi S. E., Odunola O. A., Gbadegesin M. A., Nulah K. L. Protective effect of *Juglans nigra* on sodium arsenite-induced toxicity in rats. *Pharmacognosy Res.* 2013; 5(3): 183–188. DOI: 10.4103/0974-8490.112425.
49. Hurley D. J., Hurley K. A., Galland K. L., Baker B., Berghaus L. J., Moore J. N., Majerle R. S. Evaluation of the ability of aqueous black walnut extracts to induce the production of reactive oxygen species. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72(3): 308–317. DOI: 10.2460/ajvr.72.3.308.
50. Hurley D. J., Berghaus L. J., Hurley K. A., Moore J. N. Evaluation of the in vitro effects of aqueous black walnut extract on equine mononuclear cells. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72(3): 318–325. DOI: 10.2460/ajvr.72.3.318.
51. Племенков В. В. Введение в химию природных соединений. Казань. 2001: 376.
52. Faleiros R. R., Nuovo G. J., Flechtner A. D., Belknap J. K. Presence of mononuclear cells in normal and affected laminae from the black walnut extract model of laminitis. *Equine Vet. J.* 2011; 43(1): 45–53. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00121.x.
53. Loftus J. P., Williams J. M., Belknap J. K., Black S. J. In vivo priming and ex vivo activation of equine neutrophils in black walnut extract-induced equine laminitis is not attenuated by systemic lidocaine administration. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 138(1-2): 60–69. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.06.016.
54. Дайронас Ж. В., Зилфикаров И. Н., Верниковский В. В. Способ получения БАД из коры ореха Российская Федерация патент 2608026. 23.07.2015. Available at: <http://www.fips.ru>.

REFERENCES

1. Michler C. H., Woeste K. E., Pijet P. M. Black Walnut. In: Kole C. (eds) *Forest Trees. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. 2007: 7. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-540-34541-1_6.
2. Shekhirzova M. D., Tushkanova O. V. Biological features of the black walnut in the conditions of the Republic of Adygea. *News of universities. North Caucasus region. Natural Sciences – Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region. Yestestvennyye nauki*. 2004; 2: 80–84 (in Russ.).
3. The state register of medicines of the Russian Federation. Updated 2019 May 20; cited 2019 Jun 16. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (in Russ.).
4. *Juglans nigra* L. – Black Walnut. Paleoethnobotany Laboratory Guide April 3, 2012.
5. Register of certificates of state registration (single form of the Customs Union, the Russian part). Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. The date of updating the database is 25.04.2019. Available at: <http://fp.crc.ru/evrazes/> (in Russ.).
6. Dayronas Z. V., Zilfikarov I. N., Korochinsky A. V. Innovative technologies in the production of black nut phytopreparations. *Drug development & registration*. 2014; 3: 60–64 (in Russ.).
7. Zhilina I. V. Method for producing black walnut tincture. Russian Federation patent 2383355. 2008, Dec. 22. Available at: <http://www.fips.ru>. (in Russ.).
8. Dayronas J. V. Comparative analysis of the essential oil of walnut leaves, gray walnut and black walnut. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2015; 7: 16–20 (in Russ.).
9. Zhang Y. Z., Du W. X., Fan Y., Yi J., Lyu S. C., Nadeau K. C., Thomas A. L., McHugh T. Purification and Characterization of a Black Walnut (*Juglans nigra*) Allergen, Jug n 4. *J. Agric. Food. Chem.* 2017; 65(2): 454–462. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04387.
10. Dayronas J. V. Experimental and theoretical study of medicinal plant materials containing naphthoquinones, and its standardization: thesis Dr. of pharmaceutical sciences. Moscow. 2017: 388 (in Russ.).
11. Dayronas J. V., Zilfikarov I. N. The study of phenolic compounds of the leaves of walnut and black walnut by high performance liquid chromatography. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry – Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2013; 3: 57–60 (in Russ.).
12. Bandyukova V. A. Some results of the study of the chemical composition of plants in the North Caucasus. Phenolic compounds and their biological functions. M. 1968: 95–100 (in Russ.).
13. Bandyukova V. A., Avanesov E. T. On the probability of finding some aglycones in higher plant families. *Plant resources*. 1975; 11 (3): 334–342 (in Russ.).

14. Shinkarenko A. L., Sokolov S. D., Dorodnina V. I. Chemical and pharmacological study of flavonoid complexes of walnut and black walnut leaves. *Questions of balneology, pharmacy, pharmacology*. Pyatigorsk. 1967: 365–366 (in Russ.).
15. Plant resources of Russia and neighboring states: part I – Families *Lycopodiaceae–Ephedraceae*. Part II – Additions to volumes 1–7. SPb.: *World and Family*-95. 1996: 571 (in Russ.).
16. State Pharmacopoeia of the Russian Federation: in 4 volumes XIV ed. M.: 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russ.).
17. Lee J., Vázquez-Araújo L., Adhikari K., Warmund M., Elmore J. Volatile compounds in light, medium, and dark black walnut and their influence on the sensory aromatic profile. *J. Food. Sci.* 2011; 76(2): 199–204. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.02014.x.
18. Amarowicz R., Dykes G. A., Pegg R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*. 2008; 79(3): 217–219. DOI: 10.1016/j.fitote.2007.11.019.
19. Bhargava U. C., Westfall B. A. Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extracts. *J Pharm Sci.* 1968; 57(10): 1674–1677.
20. Wenzel J., Storer Samaniego C., Wang L., Burrows L., Tucker E., Dwarshuis N., Ammerman M., Zand A. Antioxidant potential of *Juglans nigra*, black walnut, husks extracted using supercritical carbon dioxide with an ethanol modifier. *Food Sci. Nutr.* 2016; 5(2): 223–232. DOI: 10.1002/fsn3.385.
21. Polonik S. G., Tolkach A. M., Stekhova S. I., Shentsova E. B., Uvarova N. I. Synthesis and study of the antifungal activity of acetylated hydroxy glycol glycosides. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 1992; 26(6): 31–32 (in Russ.).
22. Tushkanova O. V., Boyko I. E. Investigation of antibiotic activity of juglone isolated from the pericarp *Juglans nigra* L. *Development & registration of drugs*. 2017; 1(18): 126–129 (in Russ.).
23. Scherbanovsky L. R., Nilov G. I., Rabinovich Z. D., Gorina V. A. Vegetable naphthoquinones are inhibitors of yeast, lactic acid and acetic acid bacteria. *Plant resources*. 1972; 8(1): 112–115 (in Russ.).
24. Scherbanovsky L. R., Shubina L. S. Benzo, naphtho and anthraquinones of flowering plants as antimicrobial substances. *Plant resources – Rastitel'nyye resursy*. 1975; 11(3): 445–454 (in Russ.).
25. P. Abedi, M. Yarzadeh, M. Fatahnia, F. Namjooyan, S. Nezamivand-Chegini, M. Yarzadeh. Comparison of the Effects of *Juglans Nigra* Green Husk and Clotrimazole on *Candida Albicans* in Rats. *Jundishapur Journal of Microbiology In Press*: Published online. 2017; November 30: e58151. DOI: 10.5812/jjm.58151.
26. Yakubovskaya A. Ya., Pohilo N. D., Anufriev V. F., Anisimov M. M. Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of naphthazarine compounds. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2009; 43(7): 22–24 (in Russ.).
27. Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., duCellier J., Duke P.-A. K. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC PRESS. 2002: 893.
28. Sasaki K., Abe H., Yoshizaki F. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* 2002; 25 (5): 669–670.
29. Min B. S., Nakamura N., Miyashiro H., Kim Y. H., Hattori M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2000; 48(2): 194–200.
30. Strugstad M. P., Despotovski S. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review. *Journal of Ecosystems and Management*. 2012; 13(3): 1–16.
31. Vardhini S. R. Exploring the antiviral activity of juglone by computational method. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 2014; 34(6): 456–457. DOI: 10.3109/10799893.2014.917325.
32. Inbaraj J. J., Chignell C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 2004; 17(1): 55–62. DOI: 10.1021/tx034132s.
33. Polonik S. G., Prokofieva N. G., Agafonova I. G., Uvarova N. I. Antitumor and immunostimulating activity of O- and S-acetylglycosides of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *Chemical Pharmaceutical Journal – Khimiko-farmatsevticheskij zhurnal*. 2003; 37(8): 3–4 (in Russ.).
34. Chae J. I., Cho J. H., Kim D. J., Lee K. A., Cho M. K., Nam H. S., Woo K. M., Lee S. H., Shim J. H. Phosphoinositol 3-kinase, a novel target molecule for the inhibitory effects of juglone on TPA-induced cell transformation. *Int J Mol Med*. 2012; 30(1): 8–14. DOI: 10.3892/ijmm.2012.969.
35. Fang F., Qin Y., Qi L., Fang Q., Zhao L., Chen S., Li Q., Zhang D., Wang L. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2015; 18(6): 544–548.
36. Pavan V., Ribaudo G., Zorzan M., Redaelli M., Pezzani R., Mucignat-Caretta C., Zagotto G. Antiproliferative activity of Juglone derivatives on rat glioma. *Nat. Prod. Res.* 2017; 31(6): 632–638. DOI: 10.1080/14786419.2016.1214830.
37. Xu H., Yu X., Qu S., Sui D. Juglone, isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(12): 3631–3634. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.007.
38. Zhang W., Liu A., Li Y., Zhao X., Lv S., Zhu W., Jin Y. Anticancer activity and mechanism of juglone on human cervical carcinoma HeLa cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012; 90(11): 1553–1558. DOI: 10.1139/y2012-134.
39. Ho K. V., Lei Z., Sumner L. W., Coggeshall M. V., Hsieh H. Y., Stewart G. C., Lin C. H. Identifying antibacterial compounds in black walnuts (*Juglans nigra*) using a metabolomics approach. *Metabolites*. 2018; 8(4): E58. DOI: 10.3390/metabo8040058.
40. Oguwike F. N., Ebiede S., Offor C. C. Evaluation of Efficacy of Walnut (*Juglans Nigra*) On Blood Pressure, Haematological and Biochemical Profile of Hypertensive Subjects. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*. 2014; 13(10): 75–79.
41. Dudnikov M. E. Biotechnological research on waste-free use of black walnut pericarp (*Juglans nigra* L.): dissertation ... Candidate of Biological Sciences. Stavropol. 2006: 120 (in Russ.).
42. Dudnikov M. E., Andreeva I. N., Archinova T. Y. Development of a low-waste technological scheme for processing black walnut pericarp to obtain medicinal and cosmetic products. *Development, research and marketing of new pharmaceutical products*. Pyatigorsk: Pyatigorsk SFA. 2004; 59: 81–82 (in Russ.).
43. Dudnikov M. E., Andreeva I. N., Archinova T. Yu. Comparative studies of total herbal remedies derived from the pericarp of some varieties of nuts. *Development, research and marketing of new pharmaceutical products*. Pyatigorsk: Pyatigorsk GFA. 2003; 58: 203–204 (in Russ.).
44. Zhou D. J., Mu D., Jiang M. D., Zheng S. M., Zhang Y., He S., Weng M., Zeng W. Z. Hepatoprotective effect of juglone on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and its effect on hepatic antioxidant defence and the expression levels of αSMA and collagen III. *Mol. Med. Rep.* 2015; 12 (3): 4095–4102. DOI: 10.3892/mmr.2015.3992.
45. Pozdnyakov D. I., Adzhiahmetova S. L., Chervonnaya N. M., Zolotykh D. S., Dajronas Z. V., Vernikovskij V. V., Kharchenko I. I., Pozdnyakova A. E., Lyakhova N. S. Antioxidant activity of the extracts of plants of the flora of the North Caucasus. *Int. J. Adv. Res.* 2018; 6(12): 1034–1042. DOI: 10.21474/IJAR01/8232.
46. Montoya J., Varela-Ramirez A., Estrada A., Martinez L. E., Garza K., Aguilera R. J. A fluorescence-based rapid screening assay for cytotoxic compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 325(4): 1517–1523. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.10.196.
47. Polonik S. G., Prokof'eva N. G., Agafonova I. G., Uvarova, N. I. Antitumor and immunostimulating activity of O- and S-acetylglycosides of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2003; 37(8): 3–4 (in Russ.).
48. Owumi S. E., Odunola O. A., Gbadegesin M. A., Nulah K. L. Protective effect of *Juglans nigra* on sodium arsenite-induced toxicity in rats. *Pharmacognosy Res.* 2013; 5(3): 183–188. DOI: 10.4103/0974-8490.112425.
49. Hurley D. J., Hurley K. A., Galland K. L., Baker B., Berghaus L. J., Moore J. N., Majerle R. S. Evaluation of the ability of aqueous black walnut extracts to induce the production of reactive oxygen species. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72(3): 308–317. DOI: 10.2460/ajvr.72.3.308.
50. Hurley D. J., Berghaus L. J., Hurley K. A., Moore J. N. Evaluation of the in vitro effects of aqueous black walnut extract on equine mononuclear cells. *Am. J. Vet. Res.* 2011; 72(3): 318–325. DOI: 10.2460/ajvr.72.3.318.
51. Plemenkov V. V. Introduction to the chemistry of natural compounds. Kazan. 2001: 376 (in Russ.).
52. Faleiros R. R., Nuovo G. J., Flechtner A. D., Belknap J. K. Presence of mononuclear cells in normal and affected laminae from the black walnut extract model of laminitis. *Equine Vet. J.* 2011; 43(1): 45–53. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00121.x.
53. Loftus J. P., Williams J. M., Belknap J. K., Black S. J. In vivo priming and ex vivo activation of equine neutrophils in black walnut extract-induced equine laminitis is not attenuated by systemic lidocaine administration. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 138(1-2): 60–69. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.06.016.
54. Daironas J. V., Zilfikarov I. N., Vernikovskij V. V. Method for producing dietary supplement from bark of walnut. Russian Federation patent 2608026. 23.07.2015. Available at: <http://www.fips.ru>



БИОТЕХМЕД

ГЕЛЕНДЖИК

16-17
СЕНТЯБРЯ 2019



Администрация
Краснодарского края



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



МИНПРОМТОРГ
РОССИИ



Ростех



Оригинальная статья/Research article

Антимикробная активность *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты

Д. Н. Косарева^{1*}, Е. П. Ананьева¹, А. А. Иозеп¹

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

*Контактное лицо: Косарева Дарья Николаевна. E-mail: kutkinadaria@gmail.com

Статья получена: 03.06.2019. Статья принята к печати: 11.07.2019

Резюме

Введение. В настоящее время из-за появления новых антибиотиков широкого спектра действия и синтетических химиотерапевтических средств использование препаратов нитрофуранового ряда существенно снизилось. При этом они сохраняют значение для лечения неосложненных инфекций мочевыводящих путей и кишечных инфекций, а также в качестве местных антисептиков. Однако низкая растворимость в воде, возможность возникновения нежелательных реакций, а также отсутствие пролонгированного действия значительно ограничивают их использование. Известно, что включение биологически активных веществ в молекулу полисахарида позволяет совершенствовать уже известные лекарственные препараты, при этом изменяя их свойства. Так, при введении 5-нитрофуранового цикла в нативную альгиновую кислоту и некоторые её производные привело к появлению антифунгальной активности и улучшению растворимости. Однако сведения об антимикробной активности *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты в литературе практически отсутствуют.

Цель. Синтез и изучение антимикробной активности *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты при различном содержании биологически активного фрагмента.

Материалы и методы. Для доказательства строения синтезированных веществ были использованы ИК- и УФ-спектроскопия, антимикробная активность была анализирована методом двукратных серийных разведений на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Результаты и обсуждение. При введении 5-нитрофурфура и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина в молекулу карбоксиметилальгиновой кислоты были получены образцы с антимикробной активностью, чей спектр действия отличается от фурацилина. Так, в полимерном ацилгидразоне β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обнаружено высокое противогрибковое действие в отношении *C. albicans*, фунгистатическое и фунгицидное действие достигает 1,8 и 3,6 мкг/мл, соответственно.

Заключение. Синтезированные образцы полимерных ацилгидразонов 5-нитрофурфура и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают антимикробным действием, и в отличие от фурацилина (препарат сравнения) хорошо растворимы в воде и не оказывают раздражающего действия на кожу и слизистые. Выявлено содержание 5-нитрофуранового фрагмента, при котором достигается максимальная антимикробная активность.

Ключевые слова: карбоксиметилполисахариды, *N*-арилиденгидразиды карбоксиметилполисахаридов, нитрофураны, противогрибковая и противобактериальная активность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Косарева Д. Н. и Иозеп А. А. придумали и разработали эксперимент. Косарева Д. Н. синтезировала образцы, провела исследование их структуры и определение степени замещения, а также провела исследования по микробиологической активности. Косарева Д. Н., Иозеп А. А., Ананьева Е. П. участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Косарева Д. Н., Ананьева Е. П., Иозеп А. А. Антимикробная активность *N*-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 30–34.

Antimicrobial Activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of Carboxymethylalginic Acid

Daria N. Kosareva^{1*}, Elena P. Ananieva¹, Anatolii A. Iozep¹

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

*Corresponding author: Daria N. Kosareva. E-mail: kutkinadaria@gmail.com

Received: 03.06.2019. Accepted: 11.07.2019

Abstract

Introduction. Nowadays, due to the emergence of new broad-spectrum antibiotics and synthetic chemotherapeutic agents, the use of nitrofurans has significantly decreased. At the same time, they remain important for the treatment of urinary tract infections and intestinal infections, as well as local antiseptics. However, low solubility in water, the possibility of undesirable reactions, as well as the absence of prolonged action significantly limit their use. It is known that the inclusion of biologically active substances in the polysaccharide molecule allows improving the already known drugs while changing their properties. Thus, the introduction of the 5-nitrofur cycle in native alginic acid and some of its derivatives led to the emergence of antifungal activity and improved solubility. However, the information about the antimicrobial activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid in the literature are practically absent.

Aim. Synthesis and study of antimicrobial activity of *N*-aryliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid with different content of a biologically active fragment.

Materials and methods. For the proof of the structure of the synthesized substances were used IR- and UV-spectroscopy, antimicrobial activity was analyzed by double serial dilution on the test-cultures *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

Results and discussion. With the introduction of 5-nitrofur and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein into the carboxymethylalginic acid, samples with antimicrobial activity were obtained, whose spectrum of action differs from furacilin. Thus, in the polymer acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid, a high antifungal action against *C. albicans* was found, the fungistatic and fungicidal action reaches 1,8 and 3,6 μg/ml.

Conclusion. The synthesized samples of polymer acylhydrazones 5-nitrofur and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein have antimicrobial action, and unlike furacilin are highly soluble in water and do not irritate the skin and mucous membranes. The content of 5-nitrofur fragment, at which the maximum antimicrobial activity is achieved, is revealed.

© Косарева Д. Н., Ананьева Е. П., Иозеп А. А., 2019

© Kosareva D. N., Ananieva E. P., Iozep A. A., 2019

Keywords: carboxymethylpolysaccharides, *N*-arilidenhydrazide of carboxymethylpolysaccharides, nitrofurans, antifungal and antibacterial activity.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Daria N. Kosareva and Anatolii A. Iozep invented and developed an experiment. Daria N. Kosareva synthesized samples, conducted a study of their structure and determination of the degree of substitution, as well as conducted studies on microbiological activity. Daria N. Kosareva, Anatolii A. Iozep, Elena P. Ananieva participated in the writing of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Kosareva D. N., Ananieva E. P., Iozep A. A. Antimicrobial activity of *N*-ariliden(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 30–34.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных подходов к получению физиологически активных полимеров (ФАП) является включение различных БАВ в молекулы полисахаридов. Такая модификация позволяет синтезировать новые и совершенствовать уже известные лекарственные препараты, снижая их токсичность, пролонгируя действие, изменяя фармакокинетику, растворимость в воде и некоторые другие свойства.

С этой целью разработаны различные схемы химической модификации полисахаридов (карбоксиметильная, карбоксиэтильная и некоторые другие), от правильности выбора которых зависит сохранение активности введенного в полисахарид конкретного БАВ.

Препараты нитрофуранового ряда нашли применение еще в середине прошлого века. Не смотря на появление новых химиотерапевтических средств, они используются в урологии для лечения инфекции мочевыводящих путей и желчевыделительных органов, для очищения и промывания ран (при этом они не теряют действие при наличии гноя), используются при ожогах, пролежнях и мелких повреждениях кожи. Главными недостатками препаратов нитрофуранового ряда является появление нежелательных реакций организма и низкая растворимость активного вещества в воде [1].

Ранее нами [2] была предложена схема введения 5-нитрофурилового фрагмента в альгиновую кислоту (АК), используя карбоксиэтильную схему модификации полисахаридов. При этом оказалось, что полученные производные АК (полимерные ацилгидразоны 5-нитрофурфуrolа и β -(5-нитро-2-фурил)-акролеина) обладают антимикробной активностью и в отличие от препаратов нитрофуранового ряда хорошо растворимы в воде. Синтезированные образцы ацилгидразонов β -(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

Эти результаты подтверждают и более ранние исследования активности полимерных аналогов фурацилина: 5-нитрофурфурилен- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и на-

тивной альгиновой кислот [3]. В связи с этим интересно было сравнить активность полимерных БАВ от содержания нитрофуранового цикла в карбоксиметилальгиновой кислоте.

Поэтому целью нашей работы был синтез и изучение антимикробной активности *N*-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты, а также сравнение их активности с активностью *N*-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acros Organics, США). При помощи гель-хроматографии на колонке К-16/40 («РЕАНАЛ», Венгрия) (1,6×40 см) с сефадексом марки G-200 (CAS № 9041-36-5, Sigma Aldrich, США) было установлено [4], что она состоит из полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200 000 Да, которые в целом сохраняются после алкилирования. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97%, а после очистки водной щелочью – 100%.

По разработанным ранее методикам из полисахаридов получали соли их карбоксиметилпроизводных и сами поликислоты [5], этиловые эфиры карбоксиметилальгиновой кислоты ($C_{\text{км}}=1,3$; $C_{\text{эз}}=0,3-0,48$) [5], которые использовали в дальнейшем в реакциях с биологически активными альдегидами.

N-арилиден(алкалиден)гидразидов карбоксиметилальгиновой кислоты получали по методике из статьи [2].

Строение полученных соединений доказано ИК- и УФ-спектроскопией [6].

Метод определения антимикробной активности

Противомикробную активность изучали на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ [7]. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм ATCC 6538-P, *Escherichia coli* штамм ATCC 25922, а также *Candida albicans* штамм ATCC 10231. Изучение антимикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений. Взвесь тест-микроорганизмов готовили по стандарту мутности Мак-Фарланда ($2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Мик-

робная нагрузка составляла 10^5 КОЕ/мл для бактерий и 10^4 КОЕ/мл для дрожжеподобных грибов. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающего задержку размножения (МИК_{ст} – минимальная статическая концентрация) или гибель тест-культуры (МИК_ц – минимальная цидная концентрация).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами микробиологического исследования являлись *N*-арилиден(алкилиден)гидразиды карбоксиметилальгиновой кислоты (КМАК) с различным содержанием 5-нитрофуранового цикла, полученные по схеме, разработанной в СПХФУ (рисунок 1) [6].

Полисахариды карбоксиметилировали хлоруксусной кислотой в изопропиловом спирте в присутствии щелочи. Образцы Na-соли КМАК (II) пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8 (H⁺) для получения поликислот (III). Синтез сложных эфиров (IV) проводили в кипящем этиловом спирте в условиях автокатализа. Гидразиды карбоксиметилполисахарида (V) получали при выдержке этиловых эфиров поликислот в среде гидразин гидрата в течение суток.

Для получения гидразонов (VI) к натриевой соли гидразида в уксусной кислоте прибавляли 1-5-кратный избыток этанольного раствора 5-нитрофурфурола или β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина, реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 1 ч [6]. Продукт осаждали этиловым спиртом, переосаждали из воды этанолом и сушили в вакууме.

Все синтезированные образцы хорошо растворимы в воде в отличие от препаратов нитрофуранового ряда, что облегчает их дальнейшее использование.

Полученные вещества характеризовали процентным содержанием 5-нитрофуранового фрагмента.

В качестве препарата сравнения использовали фурацилин, структура которого наиболее близка к строению синтезированных образцов. Также были проанализированы исходные субстраты: 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин. Во всех исследуемых веществах рассчитывали содержание 5-нитрофуранового фрагмента.

Микробиологический анализ гидразида поликислоты (V), используемой в синтезе полимерных гидразонов, показал, что он не активен в отношении выбранных тест-микроорганизмов (таблица 1).

Как и ожидалось, фурацилин эффективен в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Однако дрожжеподобные грибы *C. albicans* не входят в спектр действия данного средства. При этом оказалось, что исходные субстраты 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин эффективны в отношении *S. aureus*, но проявляют меньшую активность в отношении *E. coli*. В то же время данные соединения в отличие от фурацилина обладают высоким фунгицидным и фунгистатическим действием.

Следует отметить, что 5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин токсичны, вызывают раздражение кожи и слизистых. Как и фурацилин, они плохо растворяются в воде при комнатной температуре.

Введение в молекулы карбоксиметилальгиновой кислоты 5-нитро-2-фурильного фрагмента, также как и в случае карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], привело к образованию полимерных гидразонов с антимикробной активностью, но спектр действия и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) полу-

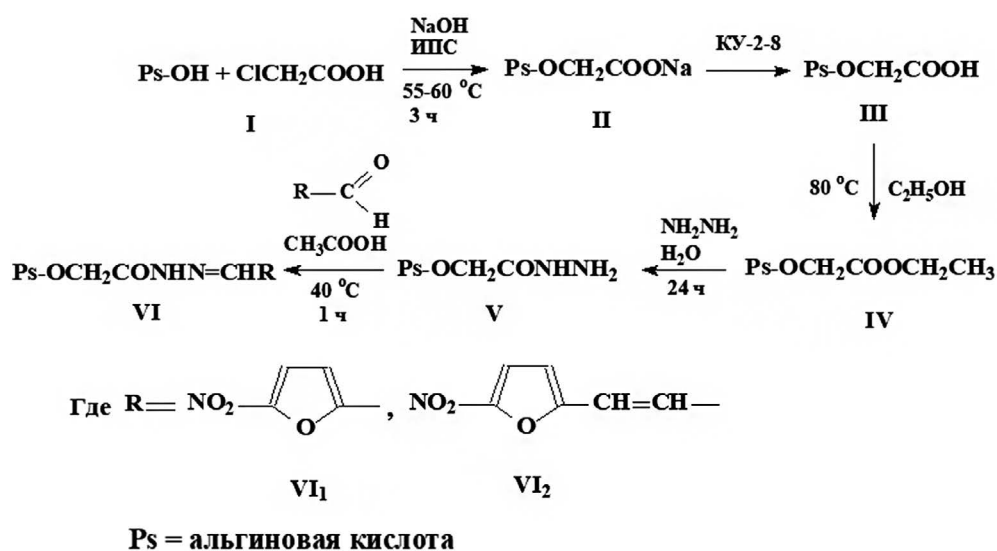


Рисунок 1. Схема химической модификации альгиновой кислоты

Figure 1. Scheme of chemical modification of alginic acid

Таблица 1. Противомикробная активность исходных веществ, препарата сравнения и N-арилиден(алкилиден)гидразидо в карбоксиметилальгиновой кислоты**Table 1.** Antimicrobial activity of the original substance, furacilin and N-arylidene(alkylidene)hydrazides of carboxymethylalginic acid

Образец	Содержание БАВ масс. %	Тест-микроорганизмы					
		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
		МИК _{сг} , мкг/мл	МИК _ц , мкг/мл	МИК _{сг} , мкг/мл	МИК _ц , мкг/мл	МИК _{сг} , мкг/мл	МИК _ц , мкг/мл
Гидразид КМАК		Не активен в отношении выбранных тест-культур					
5-нитрофурфурол		1,2	4,9	4,7	19,9	0,6	1,2
β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин		1,1	4,3	4,3	17,4	0,14	0,54
Фурацилин (препарат сравнения)		2,8	5,7	2,8	5,7	>500	-
VI ₁	4,6	5,5	21,9	Не активны в отношении <i>E.coli</i>		43,7	87,4
	7,9	2,2	17,8			35,6	71,1
	11,6	6,9	27,6			55,1	110,2
	14,8	18,5	37,0			74	148
VI ₂	5,0	6,6	13,1	Не активны в отношении <i>E.coli</i>		3,0	6,0
	11,6	0,9	1,8			1,8	3,6
	13,5	1,05	2,1			2,1	4,2
	14,7	2,3	4,6			2,3	4,6

ченных веществ несколько отличаются от активности фурацилина и исходных альдегидов (таблица 1). При этом синтезированные полимеры обладают хорошей растворимостью в воде, а также благодаря полисахаридной основе не оказывают раздражающего действия.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что активность синтезированных производных полисахаридов зависит от содержания нитрофуранового фрагмента в образце. К сожалению, четкой закономерности влияния концентрации активного вещества в полимере на его ингибирующий эффект не выявлено. Однако отмечаются определенные концентрации БАВ, при которых антимикробная активность образца максимальная, и увеличение или уменьшение содержания активного компонента в полисахаридном образце приводит к снижению эффективности антимикробного действия.

Эта закономерность наблюдается для всех исследуемых нами модифицированных полисахаридов и микроорганизмов. Так, в полимерном ацилгидразоне β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина (VI₂) при содержании активного вещества 5,0% МИК_ц составляет 13,1 мкг/мл в отношении *S. aureus* и 6,0 мкг/мл в отношении *C. albicans*. При увеличении концентрации 5-нитрофуранового цикла до 11,6% МИК_ц снижается до 1,8 мкг/мл для грамположительных бактерий и 3,6 мкг/мл для дрожжеподобных грибов. При дальнейшем увеличении содержания активного вещества до 14,7% происходит уменьшение антибактериальной и антифунгальной активности. Подобная закономерность наблюдается и для N-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты [2] и в

случае 5-нитрофурфуриденгидразидов карбокси-метилхитина [8].

Следовательно, для достижения максимальной активности модифицированного полисахарида необходимо вводить в его молекулу строго определенное количество биологически активного фрагмента. Например, в продукте реакции β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина с КМАК в полисахариде должно быть 11–12% нитрофуранового цикла.

Не смотря на то, что исходные альдегиды (5-нитрофурфурол и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеин) имеют примерно одинаковую антимикробную активность, синтезированные образцы полимерных ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина (VI₂), также как и соответствующие ацилгидразоны на основе карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], оказались значительно более активными, чем ацилгидразоны 5-нитрофурфуrolа (VI₁). Они имеют сильно выраженный бактерицидный и бактериостатический эффект в отношении *S. aureus* превосходящий препарат сравнения в 2 раза (рисунок 2) и сопоставимый с активностью исходного альдегида. В отношении *E.coli* все синтезированные соединения оказались не эффективны.

Как мы и ожидали, основываясь на исследовании N-арилиден(алкилиден)гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты [2], полученные образцы производных карбоксиметилальгиновой кислоты проявляют высокую противогрибковую активность в отношении *C. albicans*, в отличие от фурацилина. Как и по отношению к *S. aureus* наибольшей антимикробной активностью обладают продукты реакции гидразида КМАК с β-(5-нитро-2-фурил)-акролеином, фунгистатическое и фунгицидное действие которых достигает 1,8 и 3,6 мкг/мл, соответственно (рисунок 3). Следует так же

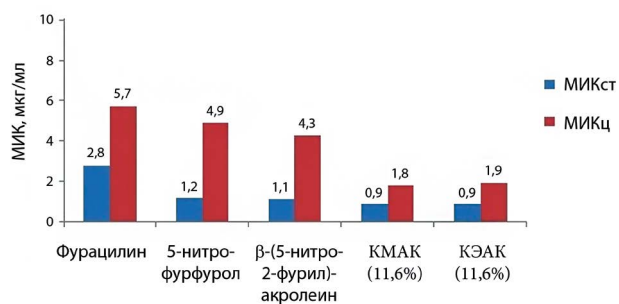


Рисунок 2. Антибактериальная активность фурацилина, 5-нитрофурфура, β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина и ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *S. aureus*

Figure 2. Antibacterial activity of furacilin, 5-nitrofurfural, β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein and acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid on *S. aureus*

отметить, что соответствующие *N*-арилден(алкилиден) производные гидразидов карбоксиметил- и карбоксиэтилальгиновой кислоты имеют примерно одинаковое фунгистатическое и фунгицидное действие 1,5–1,8 и 3,0–3,6 мкг/мл, соответственно (рисунок 3).

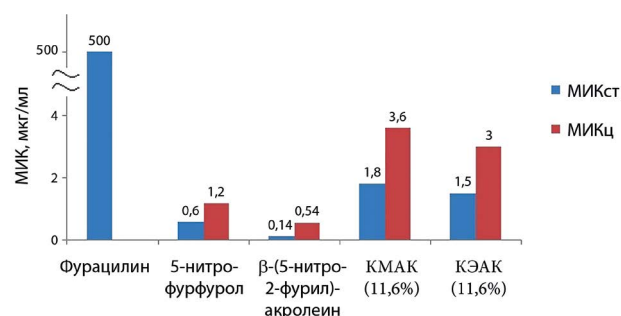


Рисунок 3. Антифунгальная активность фурацилина, 5-нитрофурфура, β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина и ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *C. albicans*

Figure 3. Antifungal activity of furacilin, 5-nitrofurfural, β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein and acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein of alginic acid on *C. albicans*

Механизм бактерицидного действия нитрофуранов связан с восстановлением нитрогрупп препаратов до токсичных продуктов, которые нарушают процесс клеточного дыхания. Модифицированные полисахариды имеют 5-нитрофурановые центры, которые способны создавать высокие концентрации биологически активного вещества в клетке, таким образом, проявляя выраженное антимикотическое действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение гидразонов 5-нитрофурфура и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина на основе карбоксиметилальгиновой кислоты показало, что синтезированные вещества обладают антимикробной активностью

и, в отличие от фурацилина и исходных альдегидов, хорошо растворимы в воде и не оказывают раздражающего действия.

Полученные образцы полимерных ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высоким фунгицидным и фунгистатическим эффектом, и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

Для достижения максимальной активности модифицированного полисахарида необходимо вводить в его молекулу строго определенное количество биологически активного фрагмента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В. Г. Клиническая фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015: 1024.
2. Косарева Д. Н., Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Ананьева Е. П., Иоэп А. А. Антимикробная активность *N*-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 3(24): 92–95.
3. Серебренникова Е. С., Давыдова В. Л., Гурина С. В., Иоэп А. А. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты. *Проблемы медицинской микологии*. 2013; 15(4): 60–62.
4. Серебренникова Е. С., Мороз М. С., Черёмушкин А. И., Иоэп А. А. Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми *N*-нуклеофилами. *Бутлеровские сообщения*. 2012; 31(7): 18–23.
5. Серебренникова Е. С., Коломина Е. О., Иоэп А. А. Карбоксиметилальгиновая кислота и её реакции со спиртами. *Бутлеровские сообщения*. 2012; 30(6): 57–62.
6. Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Куткина Д. Н., Щенникова О. Б., Иоэп А. А. Синтез *N*-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018; 2(23): 90–94.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012: 944.
8. Дударев В. Г., Тихомирова О. М., Иоэп А. А. Синтез и противомикробная активность производных карбоксиметилхитина. *Хим.-фарм. журнал*. 2013; 47(1): 32–35.

REFERENCES

1. Kukes V. G. Clinical Pharmacology. – M.: GEOTAR-Media. 2015: 1024. (in Russ.).
2. Kosareva D. N., Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Ananieva E. P., Iozep A. A. Antimicrobial activity of *N*-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2018; 3(24): 92–95.
3. Serebrennikova E. S., Davydova V. L., Gurina S. V., Iozep A. A. The study of the antimicrobial activity of some alginic acid derivatives. *Problems of Medical Mycology*. 2013; 15(4): 60–62 (in Russ.).
4. Serebrennikova E. S., Moroz M. S., Cheremushkin A. I., Iozep A. A. Reactions of carboxymethylalginic acid with some *N*-nucleophiles. *Butlerov messages*. 2012; 31(7): 18–23 (in Russ.).
5. Serebrennikova E. S., Kolomina E. O., Iozep A. A. Carboxymethylalginic acid and its reactions with alcohols. *Butlerov messages*. 2012; 30 (6): 57–62 (in Russ.).
6. Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Kut'kina D. N., Shchennikova O. B., Iozep A. A. Synthesis of *N*-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid. *Drug development & registration*. 2018; 2(23): 90–94 (in Russ.).
7. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part One / Ed. A. N. Mironova. – M.: Grief and K. 2012: 944 (in Russ.).
8. Dudarev V. G., Tikhomirova O. M., Iozep A. A. Synthesis and antimicrobial activity of carboxymethyl-chitin derivatives. *Chem.-farm. journal*. 2013; 47(1): 32–35 (in Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-35-39>
УДК 615.451.16



Оригинальная статья/Research article

Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ

С. С. Белокуров^{1*}, Е. В. Флисюк¹, И. Е. Смехова^{1**}

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

*Контактное лицо: Белокуров Сергей Сергеевич. E-mail: sergei.belokurov@pharminnotech.com

**Контактное лицо: Смехова Ирина Евгеньевна. E-mail: irina.smekhova@pharminnotech.com

Статья получена: 25.04.2019. Статья принята к печати: 25.06.2019

Резюме

Введение. Согласно данным литературы, современные технологии, в частности экстракция в ультразвуковом поле, позволяют получать концентраты биологически активных веществ (БАВ) практически с полным сохранением химического состава, присущего природному сырью, и высоким выходом экстрактивных веществ. А возможность при этом регулировать в ходе технологического процесса концентрацию извлекаемых действующих веществ открывает перспективы использования природных компонентов в качестве основной фармацевтической субстанции.

Цель. Целью настоящего исследования явился выбор оптимального метода экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ из семян пажитника сеного.

Материалы и методы. Экстракты получали при температуре 60 ± 2 °C методом динамической мацерации. Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой установки И100-6/4. В качестве экстрагентов в обоих случаях была использована вода очищенная и растворы этанола в различной концентрации от 40 до 90%. Соотношение сырье:экстрагент составляло 1:10 (по массе). Навеску растительного сырья (10 г) помещали в стакан и заливали 100 см³ экстрагента. Далее осуществляли мацерацию или обработку ультразвуком. Мацерацию проводили при перемешивании на магнитной мешалке, скорость вращения 100 об/мин. Экстрагирование осуществляли при температуре 55–60 °C в течение 5 час. Ультразвуковое воздействие на твердое растительное сырье проводили с интенсивностью в диапазоне от 17 до 22 кГц в течение 30–60 мин.

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования позволили определить количество экстрактивных веществ в семенах пажитника сеного и выбрать наиболее перспективный метод экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ. Сравнение динамической мацерации и ультразвуковой экстракции показало, что метод ультразвуковой экстракции при частоте колебаний 22 кГц является более перспективным. За 1 час экстракции удалось достичь истощения сырья. Установлено, что содержание экстрагируемых веществ прямо пропорционально зависит от продолжительности обработки и частоты ультразвуковых волн. Коэффициент корреляции составил 0,78. Однако ультразвуковая экстракция при воздействии в течение 60 мин позволяет получить большее количество экстрактивных веществ по сравнению с динамической мацерацией. Для достижения такого же уровня экстрактивных веществ методом динамической мацерации сырье необходимо обрабатывать в течение 5 час.

Заключение. Для получения извлечений из семян пажитника сеного оптимальным методом экстрагирования является ультразвуковая экстракция при частоте 22 кГц и времени экстракции 60 мин.

Ключевые слова: ультразвук, экстракция, экстракт, динамическая мацерация, пажитник сеной, лекарственное растительное сырье, экстрактивные вещества.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк и И. Е. Смехова придумали и разработали эксперимент. С. С. Белокуров провел эксперименты по экстрагированию и определению суммы экстрактивных веществ. Авторы С. С. Белокуров и Е. В. Флисюк участвовали в обработке данных. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк и И. Е. Смехова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 35–39.

Choice of Extraction Method for Receiving Extraction from Seeds of Payne Hay with the High Content of Biologically Active Substances

Sergey S. Belokurov^{1*}, Elena V. Flysyuk¹, Irina E. Smekhova^{1**}

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

*Corresponding author: Sergei S. Belokurov. E-mail: sergei.belokurov@pharminnotech.com

**Corresponding author: Irina E. Smekhova. E-mail: irina.smekhova@pharminnotech.com

Received: 25.04.2019. Accepted: 25.06.2019

Abstract

Introduction. According to the literature, modern technologies, in particular, extraction in an ultrasonic field, make it possible to obtain concentrates of biologically active substances (BAS) with almost complete preservation of the chemical composition inherent in natural raw materials and high yield of extractive substances. At the same time, the ability to regulate the concentration of recoverable active substances during the technological process opens up prospects for the use of natural components as the main pharmaceutical substance.

Aim. The purpose of this study was to select the optimal extraction method for obtaining extracts with a high content of BAS from fenugreek seeds.

Materials and methods. Extracts were obtained at a temperature of 60 ± 2 °C, by the method of dynamic maceration using an ultrasonic device. Ultrasonic extraction was performed using an ultrasonic installation И100-6/4. In both cases, purified water and ethanol solutions in various concentrations from 40 to 90% were used as extractants. The ratio of raw materials: extractant was as 1:10 (by weight). A portion of vegetable raw materials (10 g) was placed in a glass and poured 100 cm³ of extractant. Next, maceration or sonication was performed. Maceration was performed with magnetic stirring, the rotation speed was 100 rpm. Extraction was carried out at a temperature of 55–60 °C for 5 hours. Ultrasonic effects on solid plant materials were carried out with an intensity in the range from 17 to 22 kHz for 30–60 minutes.

© Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Смехова И. Е., 2019

© Belokurov S. S., Flysyuk E. V., Smekhova I. E., 2019

Results and discussion. Studies have allowed to determine the amount of extractives in the seeds of fenugreek hay, and choose the most promising method of extraction to obtain extracts with a high content of biologically active substances. A comparison was made between dynamic maceration and ultrasonic extraction. The most promising was the method of ultrasonic extraction at an oscillation frequency of 22 kHz. For 1 hour of extraction, it was possible to achieve depletion of raw materials. It is established that the content of extractable substances directly proportional depends on the duration of treatment and the frequency of ultrasonic waves. The correlation coefficient was 0.78.

Conclusion. Ultrasonic extraction when exposed for 60 minutes allows you to get a greater amount of extractives compared with dynamic maceration. To achieve the same level of extractive substances by the method of dynamic maceration, the raw materials must be processed within 5 hours.

Keywords: ultrasound, extraction, extract, dynamic maceration, fenugreek, medicinal plants, extractive substances.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk and Irina E. Smekhova was invented and developed an experiment. Sergey S. Belokurov conducted experiments on the extraction and determination of the amount of extractive substances. Authors Sergey S. Belokurov and Elena V. Flisyuk participated in data processing. Authors Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk and Irina E. Smekhova participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E. Choice of extraction method for receiving extraction from seeds of payne hay with the high content of biologically active substances. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 35–39.

ВВЕДЕНИЕ

Пажитник сенной (*Trigonella foenum-graecum*, или хельба, шамбала) – однолетнее растение семейства бобовых (Fabaceae). Центром происхождения считается Восточное Средиземноморье. В России возделывается на юге страны как пряное растение. С давних времен пажитник сенной широко используется в медицине разных народов. Целители Древней Индии отмечали благотворное влияние пажитника (шамбалы) на женское здоровье вообще и в период лактации, в частности. Экстракты из пажитника применяли при болезненных менструациях. Страдающие слабостью мужчины также использовали препараты из пажитника. В Египте с древних времен большой популярностью пользовался так называемый египетский «желтый чай» – хельба. Этот напиток на основе семян шамбалы обладает согревающим, болеутоляющим и противовоспалительным действием. Тибетские целители отмечали, что шамбала улучшает работу сердца, понижает давление, улучшает кровотворную функцию, оказывает общее тонизирующее действие на организм, что делает пряность ценной на этапе восстановления после болезней или операций.

Современная медицина подтверждает, что извлечения из шамбалы стимулируют пищеварение, улучшают аппетит, обладают обволакивающим свойством, улучшают обмен веществ у больных сахарным диабетом [1]. С лечебной целью используют главным образом зрелые семена пажитника сенного, однако, применяют и траву, собранную во время цветения [2, 3]. Согласно данным литературы семена пажитника сенного содержат следующие вещества: алкалоид тригонеллин, никотиновую и фолиевую кислоты, рутин, стероидные сапонины и фитостерины (диосгенин, ямогенин, гитогенин, тигогенин и гликозиды диосцина и ямосцина), флавоноиды, слизистые и горькие вещества, эфирные масла, жирное масло, белки, танины, витамины, фосфор, железо, калий, магний, кальций, мышьяк. Основной группой действующих веществ, представляющих интерес для получения лекарственных

препаратов и биологически активных добавок к пище, являются фитостерины, оказывающие гипогликемический эффект [4].

Традиционные методы экстракции (перколяция и мацерация), применяемые для получения извлечений, являются очень длительными и трудоемкими. В то же время, согласно данным литературы, современные технологии, в частности экстракция в ультразвуковом поле, позволяют получать концентраты биологически активных веществ (БАВ) практически с полным сохранением химического состава, присущего природному сырью, и высоким выходом экстрактивных веществ. Возможность при этом регулировать в ходе технологического процесса концентрацию извлекаемых действующих веществ открывает перспективы использования природных компонентов в качестве основной фармацевтической субстанции [5].

Целью настоящего исследования явился выбор оптимального метода экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ из семян пажитника сенного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы семена пажитника сенного, экотип Марокко, приобретенные в фирме Фитокаса г. Касабланка (Марокко). Товароведческий анализ показал соответствие сырья требованиям ГФ XIV издания [6].

Экстракты получали при температуре 60 ± 2 °C методом динамической мацерации. Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой установки И100-6/4 (рисунок 1) («Ультразвуковая техника Инлаб», г. Санкт-Петербург, Россия). В качестве экстрагентов в обоих случаях была использована вода очищенная и растворы этанола в различной концентрации от 40 до 90%. Соотношение сырье:экстрагент составляло 1:10 (по массе).

Навеску растительного сырья (10 г) помещали в стакан и заливали 100 см³ экстрагента. Далее осуществляли мацерацию или обработку ультразвуком.



Рисунок 1. Ультразвуковая установка И100-6/4

Figure 1. Ultrasonic device I100-6/4

Мацерацию проводили при перемешивании на магнитной мешалке, скорость вращения 100 об/мин. Экстрагирование осуществляли при температуре 55–60 °C в течение 5 часов.

Для проведения ультразвуковой экстракции насадку генератора погружали в стакан. Ультразвуковое воздействие на твердое растительное сырье проводили с интенсивностью в диапазоне от 17 до 22 кГц в течение 30–60 минут.

Для повышения выхода экстрагируемых веществ оптимизировали параметры ультразвуковой кавитации: температуру и продолжительность экстракции.

Затем в полученных извлечениях определяли сумму экстрактивных веществ согласно ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Извлечения тщательно взбалтывали и фильтровали через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150–200 см³. 25 см³ фильтрата пипеткой переносили в предварительно высушенную при температуре 100–105 °C до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7–9 см, и выпаривали на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушили при температуре 100–105 °C до постоянной массы, затем охлаждали в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находился кальция хлорид безводный, и немедленно взвешивали [5].

Содержание экстрактивных веществ в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{m \times 200 \times 100}{m_1(100 - W)}, \quad (1)$$

где m – масса сухого остатка, в граммах; m_1 – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Потерю в массе при высушивании сырья (W) в процентах определяли по формуле 2:

$$X = \frac{(m - m_1) \times 100}{m}, \quad (2)$$

где m – масса сырья до высушивания, в граммах; m_1 – масса сырья после высушивания, в граммах.

Экстракцию проводили трижды.

Статистическую обработку результатов проводили, используя коэффициент Стьюдента. Доверительный интервал 0,95. Полученные данные представлены на рисунках 2 и 3 и в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение ультразвука отличается существенными преимуществами по сравнению с традиционными технологиями обработки сырья. В частности, он обеспечивает более глубокое проникновение растворителя в материал с клеточной структурой, уменьшает продолжительность обработки, обеспечивает более высокий выход продукта и воспроизводимость, снижает расход растворителя, увеличивает скорость процесса, позволяет экстрагировать термолабильные вещества. Оборудование не требует больших затрат на обслуживание, для обработки расходуется меньше энергии. Таким образом процесс становится более экологичным и экономически обоснованным.

При ультразвуковой экстракции в системе «твердое тело-жидкость» основной механизм включает разрушение структуры поверхности, диффузию, капиллярные звуковые эффекты и акустические микровихри, прохождение через мембраны клеток и локальные тепловые эффекты. Увеличить коэффициент внутренней молекулярной диффузии при прочих равных условиях можно за счет снижения размеров частиц экстрагируемого материала [7].

Таблица 1. Зависимость концентрации (%) экстрагируемых веществ от времени динамической мацерации

Table 1. The dependence of the concentration (%) of the extracted substances on time dynamic maceration

Время экстрагирования, час	Экстрагент	Вода очищенная	Спирт этиловый, % об. концентрация					
			40	50	60	70	80	90
1		10,9±1,3	9,6±0,8	11,1±1,4	12,7±1,0	11,8±1,4	11,0±0,9	10,5±1,6
2		16,7±1,1	15,4±1,3	17,5±0,5	18,9±1,9	17,7±1,3	16,4±0,5	15,7±1,0
3		21,1±2,7	22,7±0,9	23,1±1,0	24,6±1,3	23,5±2,3	22,8±1,1	20,5±2,4
4		26,6±2,1	28,7±0,7	29,3±0,7	30,4±2,2	29,9±1,7	28,3±2,3	27,2±3,3
5		32,8±1,0	33,3±1,7	34,1±1,5	35,7±2,8	35,0±1,9	33,2±1,0	32,1±0,7

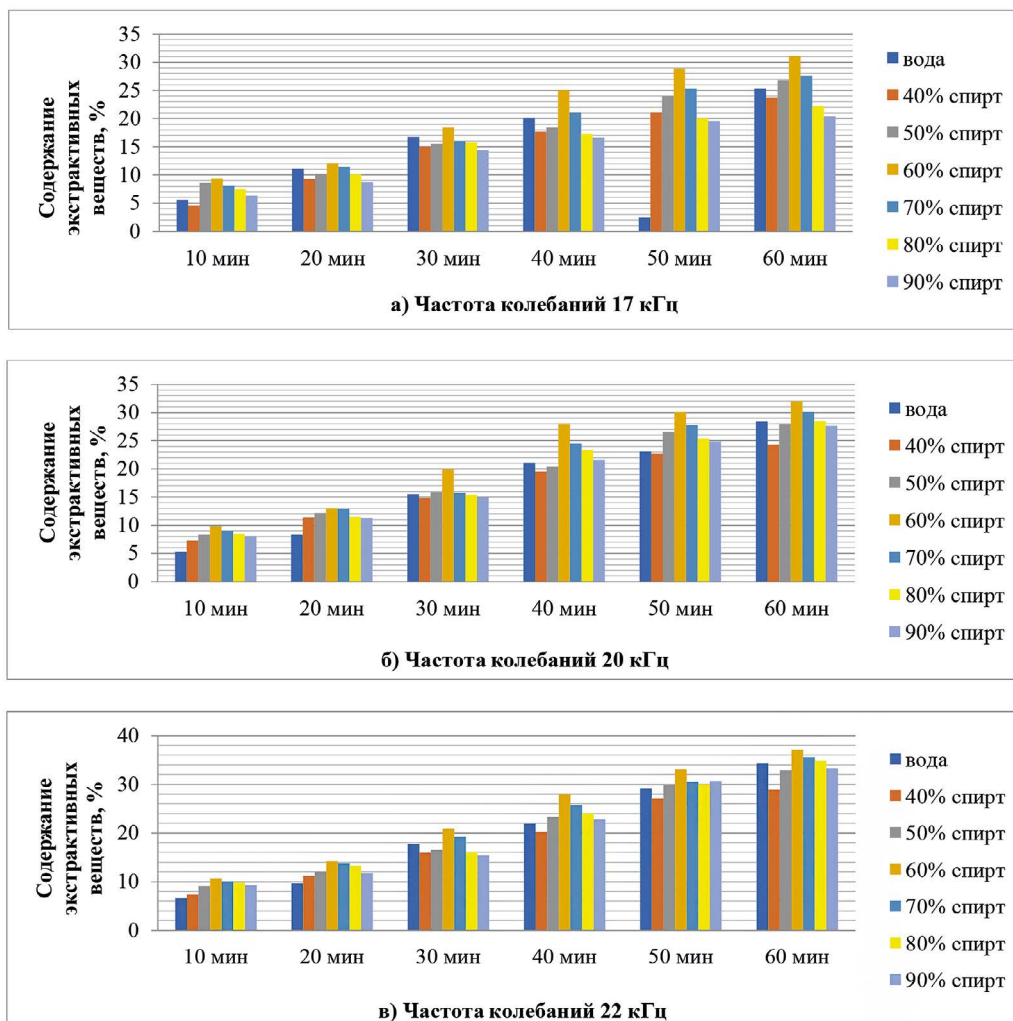


Рисунок 2. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ от времени ультразвукового воздействия

Paint 2. The dependence of the concentration of the extracted substances on the time of ultrasound exposure

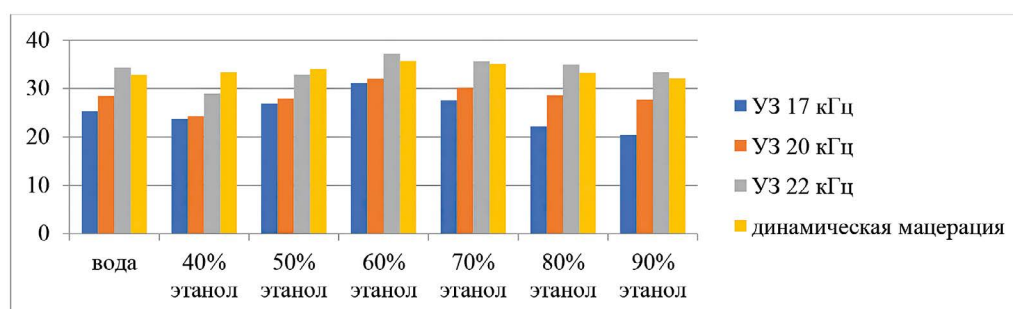


Рисунок 3. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ (%) от интенсивности ультразвуковых волн (УЗ – частота колебания)

Paint 3. The dependence of the concentration of extractable substances (%) on the intensity of ultrasonic waves (US – oscillation frequency)

Следует отметить, что во время проводимой нами ультразвуковой обработки сырья в зависимости от мощности ультразвука и продолжительности воздействия наблюдалось повышение температуры до 55–60 °С. Однако установлено, что данное изменение

температуры не приводило к инаktivации БАВ. Динамическую мацерацию проводили при этой же температуре. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ от интенсивности ультразвуковых волн представлена на рисунке 3.

Установлено, что содержание экстрагируемых веществ прямо пропорционально зависит от продолжительности обработки и частоты ультразвуковых волн (рисунок 2). Коэффициент корреляции составил 0,78. Однако ультразвуковая экстракция при воздействии в течение 60 минут позволяет получить большее количество экстрактивных веществ по сравнению с динамической мацерацией. Для достижения такого же уровня экстрактивных веществ методом динамической мацерации сырье необходимо обрабатывать в течение 5 часов.

Дальнейшее увеличение продолжительности и интенсивности обработки сырья ультразвуком (более 1 часа и 22 кГц) не приводит к увеличению содержания БАВ в экстракте, а вызывает их разрушение и инактивацию [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимальным методом экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного является ультразвуковая экстракция при частоте 22 кГц и времени экстракции 60 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Орловская Т. В. Фармакогностическое исследование некоторых культивируемых растений с целью расширения их использования в фармазии: автореф. дис. ... д-ра фарм. наук: 14.04.2002. – ГУО ВПО «Пятигорская ГФА Росздрави». – Пятигорск. 2011: 50 с.
2. Белокуров С. С., Флисюк Е. В. Сравнительный анализ различных методик для получения экстрактов с высоким содержанием биологически активных веществ. VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23–24 апреля 2018 г. – СПб.: Изд-во СПбФУ. 2018: 383–384.
3. Aswar U. et al. Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytotherapy research*. 2010; 24(10): 1482–1488.
4. Саркисян А. С. Сравнительная характеристика гипохолестеринемической активности сухих экстрактов подорожника большого, якорцев стелющихся и греческой сены у крыс. *Человек и лекарство: тезисы докладов: Российский национальный конгресс*. 2003: 658.
5. Белобородов В. В., Брик В. Н., Прокофьев А. В. Извлечение биологически активных веществ из пряно ароматического сырья в системе процессов экстрагирования-отжим. *Масложировая промышленность*. 1995; 3-4: 24–27.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. Т. 2. МЗРФ. М., 2018: 7019 с.
7. Хмелев В. Н., Сливин А. Н., Барсуков Р. В., Цыганок С. Н., Шалуннов А. В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. *Изд-во Алт. гос. техн. ун-та*. – Бийск. 2010: 203 с.

REFERENCES

1. Orlovskaya T. V. A pharmacognostic study of some cultivated plants in order to expand their use in pharmacy: author. dis. ... dr. farm sciences: 14.04.2002. – GUO VPO «Pyatigorsk CPA of Roszdrav». – Pyatigorsk. 2011: 50 p. (In Russ.).
2. Belokurov S. S., Flisyuk E. V. Comparative analysis of various methods for obtaining extracts with a high content of biologically active substances. VIII All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation «Young Pharmacy –

- Potential of the Future», St. Petersburg, April 23–24, 2018. – St. Petersburg: SPCPU Publishing House. 2018: 383–384 (In Russ.).
3. Aswar U. et al. Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytotherapy research*. 2010; 24(10): 1482–1488.
4. Sargsyan A. S. Comparative characteristics of the cholesterol-lowering activity of dry extracts of large plantain. *Man and Medicine: Abstracts: Russian National Congress*. 2003: 658 p. (In Russ.).
5. Beloborodov V. V., Brik V. N., Prokofiev A. V. Extraction of biologically active substances from spice-aromatic raw materials in the system of extraction-extraction processes. *Oil and fat industry*. 1995; 3-4: 24–27.
6. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Ed. V. 2. / MZRF. M., 2018: 7019 p. (In Russ.).
7. Khmelev, V. N., Slivin A. N., Barsukov R. V., Tsyganok S. N., Shalunov A. V. The use of high-intensity ultrasound in industry. *Publishing house Alt. state tech. University*. – Biysk. 2010: 203 p. (In Russ.).

Обзорная статья/Review article

Способ экспрессного измерения влажности пневмотранспортируемого сыпучего материала в фармацевтическом производстве, основанный на эффекте Поккельса (обзор)

В. Г. Гуляев¹, И. В. Гуляев^{2*}

1 – ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет», Россия, 603950, г. Н. Новгород, ул. Ильинская, д. 65

2 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», Россия, 109044, г. Москва, Лавров пер., д. 6

*Контактное лицо: Гуляев Иван Валерьевич. E-mail: gulyaev@gilsinp.ru

Статья получена: 08.07.2019. Статья принята к печати: 12.08.2019

Резюме

Введение. В статье представлены данные по разработке и реализации способа измерения влажности сыпучего материала при его пневмотранспортировании в фармацевтическом производстве. Способ измерения влажности теоретически основан на физическом эффекте Поккельса. Приведен анализ существующих на данный момент фармакопейных методов контроля количественного содержания воды и методов внутрипроизводственного контроля процесса сушки. Разработка новых методов и технических средств, обеспечивающих необходимое быстродействие и точность измерения влажности является актуальной задачей, особенно в фармацевтической промышленности для контроля остаточной влажности исходных веществ, промежуточных продуктов в процессе их производства и готовой продукции.

Текст. Анализ теоретических предпосылок проведенных авторами работ по способу и техническим системам измерения массы сыпучих диэлектрических материалов при их пневмотранспортировании показывает возможность измерения влажности сыпучего диэлектрического материала, перемещаемого воздухом по трубопроводу, новым бесконтактным способом. Предлагаемый способ базируется на одном измеряемом параметре – интенсивности световой волны, проходящей через ячейку Поккельса. Представлена структурная схема разработанной авторами системы автоматизированного измерения влажности сыпучих диэлектрических материалов с электрооптической ячейкой Поккельса. В статье приведено описание способа измерения влажности, основанного на эффекте Поккельса, для сыпучего материала при его пневмотранспортировании.

Заключение. Предлагаемый способ измерения влажности является бесконтактным, просто технически реализуемым, обладает повышенным быстродействием и точностью измерений, поскольку базируется на эффекте Поккельса. Способ является универсальным для определения влажности сыпучих диэлектрических материалов в процессе их пневмотранспортирования. Вышеперечисленные преимущества данного способа позволяют предположить возможность его успешного применения в фармацевтическом производстве.

Ключевые слова: сыпучий диэлектрический материал, влажность, эффект Поккельса, управление потоком, фармацевтическое производство.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. Г. Гуляев, И. В. Гуляев – обзор данных по тематике статьи, авторы патента на изобретение, написание текста статьи.

Для цитирования: Гуляев В. Г., Гуляев И. В. Способ экспрессного измерения влажности пневмотранспортируемого сыпучего материала в фармацевтическом производстве, основанный на эффекте Поккельса. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 40–43.

The Method of Express Measurement of Moisture of Bulk Material During Pneumo Transport Process in the Pharmaceutical Industry, Based on the Pockels Effect (Review)

Valery G. Gulyaev¹, Ivan V. Gulyaev^{2*}

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Nizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering», 65, Ilinskaya str., N. Novgorod, 603950, Russia

2 – Federal State Institution «State Institute of Drugs and Good Practices», 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

*Corresponding author: Valery G. Gulyaev. E-mail: gulyaev@gilsinp.ru

Received: 08.07.2019. Accepted: 12.08.2019

Abstract

Introduction. The article presents data on the development and implementation of a method for measuring the moisture content of bulk material during its pneumatic transport in pharmaceutical production. The method of measuring moisture is theoretically based on the physical Pockels effect. An analysis of the currently existing pharmacopoeial methods for monitoring the quantitative water content and methods of in-process control of the drying process is presented. The development of new methods and technical means that provide the necessary speed and accuracy of moisture measurement is an important task, especially in the pharmaceutical industry to control the residual moisture of the starting materials, intermediate products during their production and finished products.

Text. Analysis of the theoretical assumptions for the method and technical systems for measuring the mass of bulk dielectric materials during their pneumatic conveying shows the ability to measure the moisture content of the bulk dielectric material transported by air through a pipeline in a new non-contact manner. The proposed method is based on one measurable parameter – the intensity of the light wave passing through the Pockels cell. A block diagram of the system developed by the authors for automated moisture measurement of bulk dielectric materials with an electro-optical Pockels cell is presented. The article describes a method for measuring moisture, based on the Pockels effect, for bulk material during its pneumatic transport.

Conclusion. The proposed method of measuring moisture is contactless, just technically feasible, has a high speed and measurement accuracy, since it is based on the Pockels effect. The method is universal for determining the moisture content of bulk dielectric materials in the process of their pneumatic transportation. The above advantages of this method suggest the possibility of its successful application in pharmaceutical production.

Keywords: bulk dielectric material, moisture, Pockels effect, flow control, pharmaceutical production.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Гуляев В. Г., Гуляев И. В., 2019

© Gulyaev V. G., Gulyaev I. V., 2019

Contribution of the authors. Valery G. Gulyaev, Ivan V. Gulyaev – review of data on the subject of the article, authors of a patent for an invention, writing the text of the article.

For citation: Gulyaev V. G., Gulyaev I. V. The method of express measurement of moisture of bulk material during pneumo transport process in the pharmaceutical industry, based on the Pockels effect. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 40–43.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во многих отраслях промышленности при переработке сыпучих материалов применяется их пневмотранспортирование по трубопроводам. При пневмотранспортировании в технологических процессах производства необходим оперативный контроль влажности сыпучих материалов.

На сегодняшний день официальными фармакопейными методами определения воды в фармацевтическом производстве являются метод К. Фишера (полумикрометод), микрометод определения воды (кулонометрический), определение воды методом дистилляции [1–5].

Также, к косвенным методам определения содержания воды можно отнести контроль потери в массе при высушивании [6–8]. В данном случае будет определяться потеря в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ.

Вышеуказанные методы имеют ограничения. Метод К. Фишера (полумикрометод), микрометод определения воды (кулонометрический) требуют использование дорогостоящих титраторов, стандартных образцов для их калибровки и реактивов. Применение метода дистилляции и контроля потери в массе при высушивании также требует наличия специального оборудования, а также связано с нагреванием испытуемых образцов, что значительно сужает область применения. Кроме того, все вышеперечисленные методы являются контактными и требуют отбора испытуемых образцов, для которого необходимо организовать условия, предотвращающие контаминацию материала, работу квалифицированного персонала.

Для внутрипроизводственного контроля процесса сушки известно использование других методов. Например, применение спектроскопических методов, включая инфракрасную спектроскопию (IR), инфракрасную спектроскопию в ближней области спектра (NIR) и спектроскопию комбинационного рассеяния света (рамановская спектроскопия спектроскопию), зависит от количественного содержания растворителя относительно твердого материала для контактных измерений, то есть предполагающих прямое соприкосновение пробоотборника и высушиваемого материала) или количественного содержания паров в потоке, выходящем через газоотводное отверстие сушилки [9, 10]. Удаление воды в процессе сушки может контролироваться с помощью конденсационного гигрометра, которые обычно устанавливают в газоотводной трубке между сушильной камерой и вакуумным насосом [9, 11]. Для определения кристаллической структу-

ры и выявления изменений морфологических свойств или гидратирования/сольватирования молекулы может применяться порошковый рентгеноструктурный анализ (XPRD). Как и другие автономные методы, порошковый рентгеноструктурный анализ как аналитический метод обладает основным недостатком, заключающимся в том, что для анализа используют образцы, изъятые из сохнущего материала, которые могут оказаться нехарактерными для всего материала, находящегося в сушилке [9].

Резюмируя вышесказанное, при использовании существующих на данный момент фармакопейных методов контроля количественного содержания воды и методов внутрипроизводственного контроля процесса сушки производитель несет значительные затраты ресурсов и времени.

Разработка новых методов и технических средств, обеспечивающих необходимое быстроедействие и точность измерения влажности является актуальной задачей, особенно в фармацевтическом производстве для контроля остаточной влажности исходных веществ, промежуточных продуктов в процессе их производства и готовой продукции.

Анализ теоретических предпосылок проведенных работ по способу и техническим системам измерения массы сыпучих диэлектрических материалов при их пневмотранспортировании [12–15] показывает возможность измерения влажности сыпучего диэлектрического материала, перемещаемого воздухом по трубопроводу, новым бесконтактным способом. Предлагаемый способ базируется на одном измеряемом параметре – интенсивности световой волны, проходящей через ячейку Поккельса.

В способе двухфазный поток сыпучего диэлектрического материала, перемещаемого воздухом по трубопроводу, пропускают через электрическое поле, создаваемое конденсатором, расположенным в диэлектрической вставке в трубопроводе. Световая волна, проходящая через амплитудный оптический модулятор света (ячейка Поккельса), амплитудно модулируется токами поляризации диэлектрического материала и регистрируется ее интенсивность от времени транспортирования.

Первоначально пропускают эталонный материал с заданным содержанием влаги и определяют элементарную площадь под графиком зависимости интенсивности световой волны от времени – цикл измерения для первоначально пропускаемого эталонного материала с заданным содержанием влаги. Затем пропускают поток исследуемого материала, повторяют операции по измерению элементарной площади под

графиком зависимости интенсивности световой волны от времени – цикл измерения для потока исследуемого материала. Вычисляют значение влажности по формуле:

$$W = \frac{\Delta S_1 - \Delta S_2}{\Delta S_2}, \quad (1)$$

где W – влажность элементарной массы транспортируемого материала за заданный промежуток времени – цикл измерения по отношению к эталонному материалу; ΔS_1 – элементарная площадь под графиком зависимости световой волны от времени за цикл измерения для исследуемого материала; ΔS_2 – элементарная площадь под графиком зависимости световой волны от времени за цикл измерения для данного эталонного материала с заданным содержанием влаги.

Определяют полную площадь под графиком зависимости интенсивности световой волны от времени транспортирования исследуемого материала сложением элементарных площадей по формуле:

$$S_1 = \sum_{i=1}^n (\Delta S_1)_i, \quad (2)$$

где n – число циклов измерения за заданное время транспортирования.

Определяют полную площадь под графиком интенсивности световой волны от времени транспортирования данного эталонного материала с заданным содержанием влаги путем циклического сложения элементарных площадей по формуле:

$$S_2 = \sum_{i=1}^n (\Delta S_2)_i. \quad (3)$$

Вычисляют среднее значение влажности по отношению к эталонному материалу по формуле:

$$W_{\text{ср. отн.}} = \frac{S_1 - S_2}{S_2}. \quad (4)$$

Вычисляют истинную влажность исследуемого материала по формуле:

$$W_{\text{ср.}} = W_{\text{ср. отн.}} \cdot k, \quad (5)$$

где k – доля содержания влаги в эталонном материале с заданным содержанием влаги.

Способ может быть осуществлен с помощью устройства, изображенного на рисунке 1.

Устройство содержит встроенную в трубопровод 1 измерительную диэлектрическую вставку 2, высоковольтный источник питания 3, который соединен с последовательно включенными обкладками 4 измерительного конденсатора и обкладками 5 регистрирующего конденсатора. Регистрирующий конденсатор и расположенный между его обкладками кристалл ниобата лития 6 представляют амплитудно-оптический

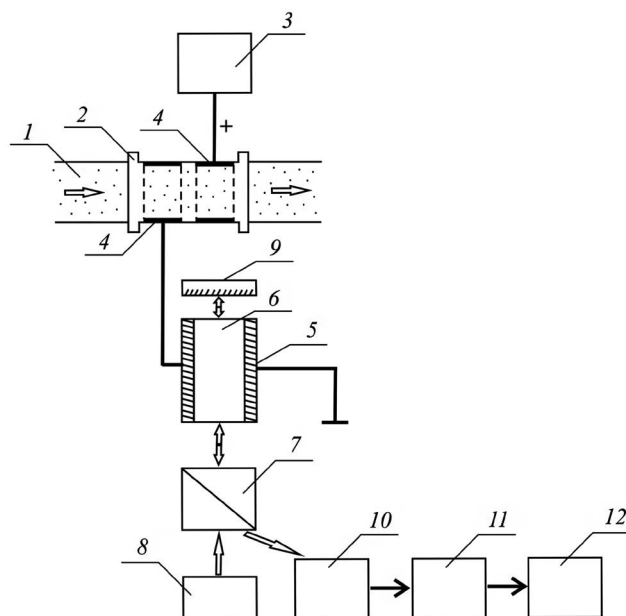


Рисунок 1. Примерная структурная схема измерителя влажности пневмотранспортируемого сыпучего материала

Figure 1. An exemplary block diagram of a moisture meter for a pneumotransport bulk material

модулятор Поккельса. На вход модулятора через поляризирующую призму 7 поступает световая волна, генерируемая лазерным диодом 8, которая на выходе из кристалла 6 отражается плоским зеркалом 9 в обратном направлении. Промодулированная дважды – в прямом и обратном направлении, световая волна через поляризирующую призму 7 поступает на фотоприемник 10, который соединен с микроконтроллером 11 и индикатором 12.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом. Двухфазный материал-воздушный поток, материальная составляющая которого представляет сыпучий диэлектрический материал, пропускают по трубопроводу 1 через измерительную вставку 2 с вмонтированными в нее обкладками 4 измерительного конденсатора, которые подключены последовательно к высоковольтному источнику питания 3 и к обкладкам 5 регистрирующего конденсатора.

Высоковольтный источник питания создает электрическое поле на обкладках 4 измерительного конденсатора направленное по движению двухфазного материал-воздушного потока. Движение двухфазного материал-воздушного потока вызывает изменение емкости измерительного конденсатора 4 пропорционально изменению концентрации материала. Соответственно изменяется напряженность электрического поля в последовательно включенной ячейке Поккельса, состоящей из кристалла ниобата лития 6 с обкладками регистрирующего конденсатора 5.

Изменение напряженности электрического поля вызывает амплитудную модуляцию светового потока, генерируемого лазерным излучателем 8, проходящего через поляризирующую призму 7 и электрооптический элемент – кристалл ниобата лития 6. Промодулирован-

ный световой поток отражается в плоском зеркале 9 и проходит в обратном направлении через электрооптический элемент 6. Зеркало 9 позволяет удвоить длину оптического пути светового потока через электрооптический элемент и соответственно его модуляцию, повысить чувствительность измерителя [16].

Интенсивность амплитудно-модулированной световой волны, в зависимости от концентрации проходящего через измерительную вставку материала и его диэлектрической проницаемости, регистрируется фотоприемником 10. С выхода фотоприемника аналоговый электрический сигнал напряжения поступает в микроконтроллер 11, содержащий усилитель сигнала и АЦП – амплитудно-цифровой преобразователь. После преобразования измеренных аналоговых сигналов напряжения в цифровую форму вычисляется влажность элементарной массы транспортируемого материала по отношению к эталонному материалу за цикл измерения в соответствии с заложенным алгоритмом (1), а также среднее значение влажности по отношению к эталонному материалу за время транспортирования (4) и истинная влажность исследуемого материала (5). С выхода микроконтроллера 11 информацию направляют на индикатор 12. На индикаторе отображается образ представления результатов измерения влажности в виде цифр, графиков и гистограмм. Устройство изготавливают из покупных изделий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предлагаемый способ измерения влажности является бесконтактным, просто технически реализуемым, обладает повышенным быстродействием и точностью измерений поскольку базируется на эффекте Поккельса. Способ является универсальным для определения влажности сыпучих диэлектрических материалов в технологическом процессе их пневмотранспортирования. Вышеперечисленные преимущества данного способа позволяют предположить возможность его успешного применения в фармацевтическом производстве.

ЛИТЕРАТУРА

- ОФС.1.2.3.002.15 «Определение воды». Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.5.32. «Water: micro determination».
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.5.12. «Water: semi-micro determination».
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.2.13. «Determination of water by distillation».
- USP 40 <921> «Water determination». Available at: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c921.pdf>.
- ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.2.32. «Loss on drying».
- USP 40 <731> «Loss on drying». Available at: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c731.pdf>.
- Д. Дж. Ам Энде и др. Производство лекарственных средств. Химическая технология от R&D до производства: пер. с англ. / Под ред. В. В. Береговых. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2015: 1280 с.

- Burgbacher J., Wiss. J. Industrial applications of online monitoring of drying processes of drug substances using NIR. *Org. Process Res. Dev.* 2008; 12: 235–242.
- Cypes S. H., Wenslow R. M., Thomas S. M., Chen A. M., Dorwart J. G., Corte J. R., Kaba M. Drying an organic monohydrate: crystal form instabilities and a factory-scale drying scheme to ensure monohydrate preservation. *Org. Process Res. Dev.* 2004; 8: 576–582.
- Патент 2518514 РФ Способ измерения расхода двухфазного потока диэлектрического материала, перемещаемого воздухом по металлическому трубопроводу. Гуляев В. Г., Плотников Н. М., Плотников М. М. Нижегород. Гос. Архитектур.-строит. ун-т. Опубл. 11.04.2014.
- Патент 2565348 РФ Измеритель расхода двухфазного потока диэлектрических материалов, перемещаемых воздухом по металлическому трубопроводу. Гуляев В. Г., Гуляев И. В. Нижегород. Гос. Архитектур.-строит. ун-т. Опубл. 20.10.2015.
- Гуляев В. Г. Измеритель расхода сыпучих диэлектрических материалов, транспортируемых воздухом в закрытых трубопроводах. *Приборы.* 2011; 1(127): 35–39.
- Гуляев В. Г., Гуляев И. В. Способ измерения количества пневмотранспортируемого сыпучего материала в фармацевтическом производстве, основанный на эффекте Поккельса. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018; 2(23): 52–56.
- Гуляев В. Г., Гуляев И. В. Способы повышения эксплуатационных характеристик расходомера пневмотранспортируемых сыпучих материалов. *Приволжский научный журнал.* 2013; 3: 24–29.

REFERENCES

- OFS.1.2.3.002.15 «Determination of water». State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. M.: Scientific Center for Expertise of Medical Applications, 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.5.32. «Water: micro determination».
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.5.12. «Water: semi-micro determination».
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.2.13. «Determination of water by distillation».
- USP 40 <921> «Water determination». Available at: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c921.pdf>.
- OFS.1.2.1.0010.15 «Loss in weight during drying». State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. M.: Scientific Center for Expertise of Medical Applications, 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
- European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. 2.2.32. «Loss on drying».
- USP 40 <731> «Loss on drying». Available at: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c731.pdf>.
- Am Ende D.J. et al. Production of medicines. Chemical technology from R&D to production: Per. from English / Ed. V. V. Beregovykh. – SPb.: CSC «Profession», 2015: 1280 p.
- Burgbacher J., Wiss. J. Industrial applications of online monitoring of drying processes of drug substances using NIR. *Org. Process Res. Dev.* 2008; 12: 235–242.
- Cypes S. H., Wenslow R. M., Thomas S. M., Chen A. M., Dorwart J. G., Corte J. R., Kaba M. Drying an organic monohydrate: crystal form instabilities and a factory-scale drying scheme to ensure monohydrate preservation. *Org. Process Res. Dev.* 2004; 8: 576–582.
- Patent 2518514 of the Russian Federation A method for measuring the flow rate of a two-phase flow of a dielectric material that is transported by air through a metal pipeline. Gulyaev V. G., Plotnikov N. M., Plotnikov M. M. Nizhegor. State Architecture.-build. un-t Publ. 04.11.2014.
- Patent 2565348 of the Russian Federation Measuring instrument of a flow of a two-phase stream of dielectric materials moved by air on the metal pipeline. Gulyaev V. G., Gulyaev I. V. Nizhegor. State Architecture.-build. un-t Publ. 20.10.2015.
- Gulyaev V. G. Measurement of flow of bulk dielectric materials transported by air in closed pipelines. *Devices.* 2011; 1 (127): 35–39.
- Gulyaev V. G., Gulyaev I.V. A method for measuring the amount of pneumatically transportable bulk material in pharmaceutical production, based on the Pockels effect. *Drug development & registration.* 2018; 2 (23): 52–56.
- Gulyaev V. G., Gulyaev I. V. Methods of improving the performance of the flow meter of pneumatic-transported bulk materials. *Volga scientific journal.* 2013; 3: 24–29.

IV ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP-КОНФЕРЕНЦИЯ

с международным участием

23-25 СЕНТЯБРЯ 2019

СВЕТЛОГОРСК, КАЛИНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ

1000+
участников

110+
спикеров

300+
руководителей

470+
организаций

Генеральный партнер



Стратегический партнер



ГЕДЕОН РИХТЕР

Официальный партнер



ФАРМАСИНТЕЗ

Региональный партнер

МИРАМИСТИН®

ЭКОБАЛТИК
БИЗНЕС ПАРК

Генеральный информационный партнер

Новости GMP

Языки: русский, английский

www.gosgmp.ru

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48>
УДК 615.014



Оригинальная статья/Research article

Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design

А. Н. Голубев¹, Т. Ш. Нгуен¹, А. В. Басевич¹, В. В. Сорокин^{1*}, И. Е. Каухова¹, А. Л. Марченко¹, Е. М. Смирнова¹

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

*Контактное лицо: Сорокин Владислав В. E-mail: spcra@outlook.com

Статья получена: 19.07.2019. Статья принята к печати: 26.08.2019

Резюме

Введение. Для разработки состава лекарственных препаратов в настоящее время рекомендуется применять современный подход – качество через разработку (quality by design). Одним из методов внедрения данного подхода является использование современного статистического программного обеспечения.

Цель. Целью работы была разработка состава и технологии таблеток с применением программы Minitab (ver. 18), Minitab LLC, США и концепции «quality by design».

Материалы и методы. Для исследования использовалась программа Minitab 18. В программе разрабатывался план эксперимента и проводилась оценка полученных на основании его моделей с помощью методов математической статистики.

Результаты и обсуждение. Проведена разработка состава и технологии таблеток на примере шипучих таблеток с сухим экстрактом растительного происхождения методом прямого прессования с применением концепции «quality by design». Предложены алгоритмы действий по использованию программного пакета Minitab для целей фармацевтической разработки. Построен план эксперимента и сгенерированы модели зависимости показателей качества от состава и технологических параметров [основных критических атрибутов качества (CQA) от критических параметров процесса (CPP)]. Полученные модели проанализированы с помощью статистических инструментов.

Заключение. На основании результатов работы был предложен алгоритм разработки лекарственных препаратов в программе Minitab с использованием концепции quality by design и предложен состав таблеток с сухим экстрактом растительного происхождения.

Ключевые слова: качество через разработку, quality by design, разработка лекарственных препаратов, многофакторный эксперимент, регрессионный анализ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы В. В. Сорокин, А. В. Басевич, И. Е. Каухова, А. Л. Марченко, Т. Ш. Нгуен разработали эксперимент, авторы А. Н. Голубев и Е. М. Смирнова провели эксперимент. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов эксперимента и написании текста статьи.

Для цитирования: Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 45–48.

Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design

Artem N. Golubev¹, Thi S. Nguyen¹, Anna V. Basevich¹, Vladislav V. Sorokin^{1*}, Irina E. Kaukhova¹, Aleksei L. Marchenko¹, Elena M. Smirnova¹

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

*Corresponding author: Vladislav V. Sorokin. E-mail: spcra@outlook.com

Received: 19.07.2019. Accepted: 26.08.2019

Abstract

Introduction. The development of the composition of drugs is very difficult and long process. To implement it, it is currently recommended to apply a modern approach – quality through the development of Quality by design. One of the methods for introducing this approach is the use of multifactorial experiments.

Aim. The aim of the work was to develop the composition and technology of effervescent tablets using the Minitab program.

Materials and methods. For the study used the program Minitab (ver. 18.), Minitab LLC, USA. The program created an experiment plan and evaluated those obtained on the basis of its models using regression analysis.

Results and discussion. The composition and technology of effervescent tablets was developed by direct compression using the principles of Quality by design. Algorithms of actions for using the Minitab software package for development are proposed. An experiment plan was constructed and models of the dependence of quality indicators on the composition and technological parameters were generated. The resulting sub-sections were analyzed using regression analysis tools.

Conclusion. Based on the results of the work, the composition of effervescent tablets obtained by direct compression technology, as well as the algorithm of drug development in the Minitab program, was proposed.

Keywords: quality by design, drug development, multifactorial experiment, regression analysis.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М., 2019

© Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A.V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M., 2019

Contribution of the authors. Authors Vladislav V. Sorokin, Anna V. Basevich, Irina E. Kaukhova, Aleksey L. Marchenko, Thi S. Nguyen developed an experiment, the authors Artem N. Golubev and Elena M. Smirnova conducted an experiment. All authors participated in data processing, discussing the results of the experiment and writing the text of the article.

For citation: Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A.V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the development of drugs with the use of modern statistical software concepts and Quality-by-Design. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 45–48.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка состава лекарственных препаратов очень сложный и долгий процесс. Для его реализации в настоящее время рекомендуется применять современный подход – качество через разработку (quality by design). Данный подход позволяет не только облегчить процесс разработки, но и внедрять основные показатели качества уже на раннем этапе жизни препарата [1]. Использование данного метода невозможно без применения статистических методов, используемых как при самой разработке, так и при обработке результатов экспериментов.

Одним из таких методов является использование многофакторных экспериментов. Многофакторные эксперименты позволяют быстрее производить исследования и учитывать влияние различных факторов на состав и качество лекарственного средства, что в конечном итоге приводит к снижению затрат на разработку и ее продолжительность [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Применение концепции «качество через разработку» осуществлялось на примере шипучих таблеток с сухим экстрактом растительного происхождения.

Для разработки плана эксперимента нами использовалась одна из современных статистических программ – Minitab (ver. 18), Minitab LLC, США. Программа позволяет создавать планы эксперимента как для однофакторных, так и для многофакторных экспериментов, а также производить анализ полученных данных с использованием различных инструментов, в том числе регрессионного анализа [3].

Для разработки состава лекарственной формы в программе Minitab возможно использование специального вида плана эксперимента – Mixture Design (дизайн смеси). Данный метод позволяет определить оптимальное соотношение компонентов в смеси, что требуется при разработке составов лекарственных средств. Помимо изменения состава компонентов в программе предусмотрено введение дополнительных переменных в рамках которых могут выступать различные технологические параметры (например, давление прессования, температура сушки вспомогательных материалов) [3].

Для анализа данных нами использовались инструменты регрессионного анализа. Регрессионный анализ – статический метод исследования влияния одной или нескольких независимых переменных $X_1, X_2 \dots X_n$

на зависимую переменную Y [4]. Данный метод позволяет определить:

- зависимость между $X_1, X_2 \dots X_n$ и Y , тем самым, например, отсеять факторы не влияющие на показатели качества
- предсказать значения зависимых переменных с помощью независимых, например, при расчете показателей качества исходя из изменения состава [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания плана эксперимента предварительно был выбран примерный компонентный состав и предложены границы содержания каждого из компонентов.

Выбор диапазонов для каждого параметра – это самый сложный компонент проектирования эксперимента. В общем, диапазон должен быть не слишком большим и не слишком узким. Если диапазон слишком узкий, то существует риск не увидеть влияние параметра на процесс. Если диапазон будет слишком широк, влияние параметра будет определяться на макроуровне, но может не предоставлять информацию о микроуровне и скрывать влияние других параметров.

Для уменьшения числа экспериментов винная кислота и натрия гидрокарбонат, использующиеся в составе шипучих таблеток, были введены в программу как единый компонент – «шипучая часть».

Также в модели учитывали технологические параметры, которые оказывали наибольшее влияние на качество получаемых таблеток.

Таким образом нами были определены критические параметры процесса (CPP): параметры процесса, изменчивость которого влияет на критический атрибут качества и должен контролироваться для обеспечения требуемого качества процесса [ICH Q8 (R2)]. Границы каждой из рассматриваемых переменных представлены в таблице 1.

После этого в программе Minitab был составлен план эксперимента для определения оптимального состава смеси. Для этого предложен следующий алгоритм:

1. Stat > DOE > Mixture > Create Mixture Design.
2. В поле «Type of Design» выбрать «Extreme vertices».
3. В поле «Number of Components» выбрать количество используемых компонентов (в нашем случае – 3).
4. Выбрать «Designs».
5. Выбрать «Components» и в соответствующие поля ввести наименование компонентов.

- Ввести нижнюю и верхнюю границы для содержания каждого компонента.
- Выбрать «Process Vars».
- В появившемся окне задать дополнительные переменные процесса (в нашем случае «давление прессования» и «влажность крахмала»).
- Задать границы изменения (для прессования Numeric и ввести значения, для степени сухости крахмала – текстовое и ввести «высушенный» и «невысушенный»).
- Провести анализ.

Таблица 1. Граничные значения содержания компонентов и технологических параметров

Table 1. Boundary values of the content of components and technological parameters

Границы содержания компонентов	
Действующее вещество (сухой экстракт)	0,03 г
Шипучая часть	от 85% до 70% от массы таблетки
Крахмал	от 0,75 до 1,5% от массы таблетки
Декстроза	до 100%
Границы технологических параметров	
Давление прессования	От 50 до 300 МПа
Влажность крахмала	Высушенный (1-1,5% влаги) / невысушенный (5-6,5% влаги)

Результатом реализации алгоритма является поле с полученным планом эксперимента. Каждая строка – отдельный эксперимент; здесь указывается масса каждого компонента и технологические параметры проведения процесса.

После составления плана эксперимента в соответствии с ним были получены данные составы. Наработку образцов осуществляли с использованием принципа рандомизации: составы производились в случайном порядке, что помогло «усреднить» неконтролируемые шумовые переменные (скрытые или сторонние переменные).

Полученные образцы были проанализированы по основным критическим атрибутам качества (CQA). В нашем случае это были:

- Проверка прочности на истираемость (Государственная Фармакопея РФ XIV изд. ОФС 1.4.2.0004.15 Истираемость [State Pharmacopeia of Russia 14th edition, OFS 1.4.2.0004.15 Abrasion]).
- Проверка прочности на сжатие (излом) (Государственная Фармакопея РФ XIV изд. ОФС 1.4.2.0011.15 Прочность таблеток на раздавливание [State Pharmacopeia of Russia 14th edition, OFS 1.4.2.0011.15 Crush Strength Tablets]).
- Проверка распадаемости (Государственная Фармакопея РФ XIV изд. ОФС 1.4.1.0015.15 Таблетки [State Pharmacopeia of Russia 14th edition, OFS 1.4.1.0015.15 Tablet]).

В статистическом «жаргоне» CQAs являются отвитами (Y), а CPP являются предикторами (X). Анализ данных (поиск зависимости между CQA и CPP) прово-

дился с использованием программы Minitab и функции «регрессионный анализ». Для этого необходимо было осуществить следующую последовательность действий:

- На верхней панели выбрать Assistant > Regression > Optimaze Response.
- В появившемся окне в область «Response variable» внести показатели качества и выбрать целевое значение показателя (например, минимальное время растворения).
- В области «Continuous X Variables» выбрать параметры, которые могут влиять на выбранный ранее показатель качества (содержание каждого компонента, давление прессования, влажность крахмала).
- Данные действия повторяются для каждого из показателей качества.

В результате исполнения данного алгоритма в рабочем окне для каждого из показателей качества имеем:

- Окно оценки полученной модели.
- Варианты составов, наиболее подходящих под заданный критерий.
- Влияние каждой переменной на показатель качества.
- Регрессионное уравнение, позволяющее рассчитать данный показатель для неизученного состава.

При разработке состава и технологии шипучих таблеток проведена оценка каждой из полученных моделей по двум показателям:

- Коэффициенту, оценивающему связь между показателем качества и переменными. Приемлемым считается значение меньше 0,1.
- Коэффициенту регрессии, оценивающему какой процент экспериментальных данных описывается полученной моделью (приемлемым считается значение больше 40%).

Оценка данных, полученных при разработке представлена на рисунке 1.

Наиболее значимым параметром модели считается «распадаемость» или «время растворения» таблетки, так как этот показатель напрямую может быть оценен потребителем. При этом составы, предложенные программой, должны удовлетворять по прочности на сжатие и истирание.

Анализ ожидаемых показателей качества проведен по полученным уравнениям регрессии.

На основании анализа результатов, было установлено, что критериям приемлемости удовлетворяет следующий состав (на одну таблетку): сухой экстракт растительного происхождения – 0,03 г, крахмал кукурузный – 0,0045 г, винная кислота – 0,0537 г, гидрокарбонат натрия – 0,2148 г, декстроза – 0,027 г. Оптимальное давление прессования находится в пределах 200–250 МПа.

При этом исследования показали, что осуществлять предварительное высушивание крахмала не требуется при использовании данного состава и выбранного давления прессования.

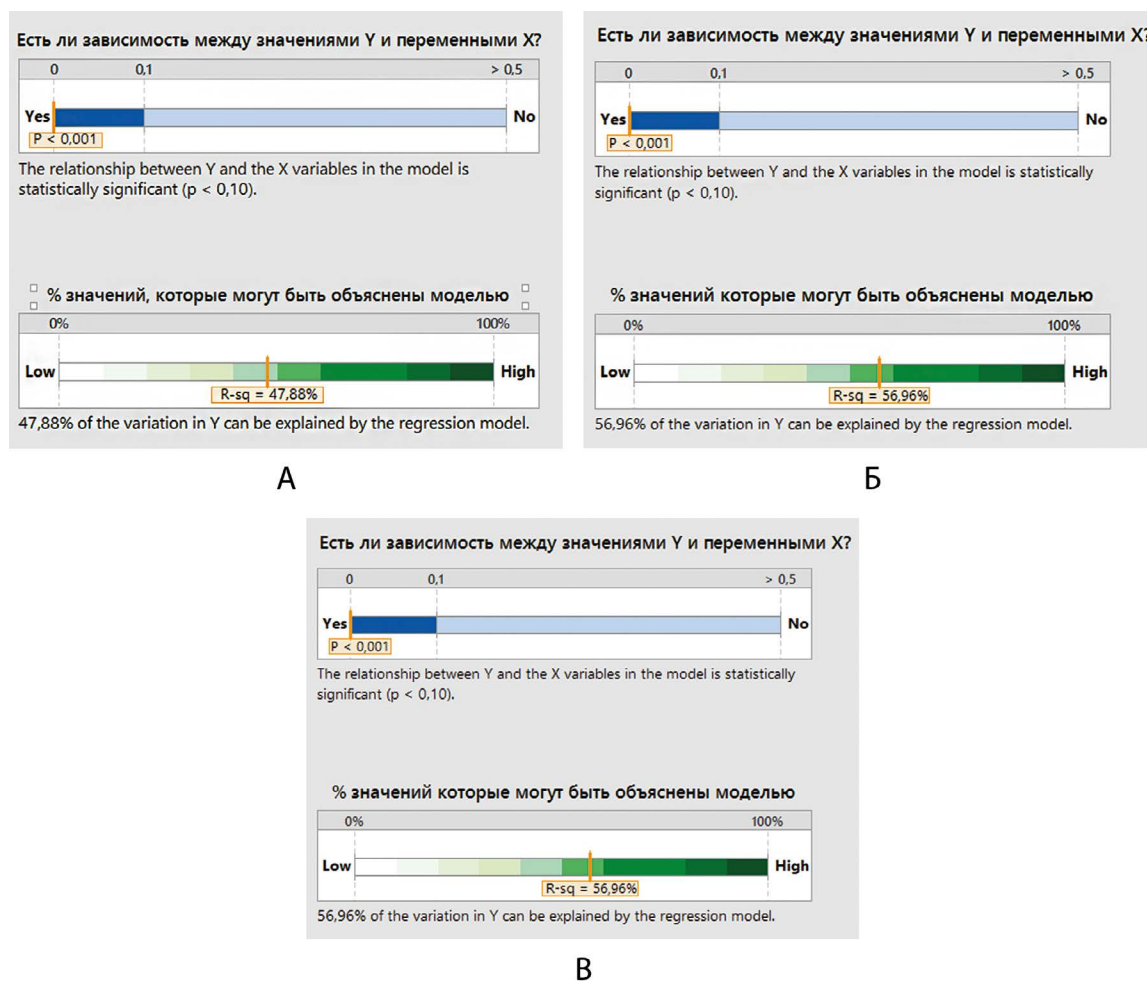


Рисунок 1. Диаграммы оценки полученных моделей (А – модель для прочности на истирание; Б – модель для времени растворения, В – модель для прочности на сжатие)

Figure 1. Evaluation diagrams of the models obtained (А – model for abrasion resistance; Б – model for dissolution time, В-model for compressive strength; В – model for taste)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам исследования представлен алгоритм использования программы статистической обработки данных – Minitab для определения оптимальных соотношений компонентов, при разработке состава шипучих таблеток методом прямого прессования. Показано, что возможно построение математических моделей, описывающих с высокой точностью зависимость технологических свойств таблеток (прочности на сжатие и истирание, распадаемости) от количества вспомогательных веществ и технологических параметров производства.

Разработан состав шипучих таблеток: сухой экстракт – 0,03 г, крахмал кукурузный – 0,0045 г, винная кислота – 0,0537 г, гидрокарбонат натрия – 0,2148 г, декстроза – 0,027 г. Определено оптимальное давление прессования: 200–250 МПа. Установлено, что при выбранном составе вспомогательных веществ и давлении прессования не требуется предварительное высушивание крахмала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarwar B., Hasnain M. S. Pharmaceutical Quality by design Principles and applications. *Academic Press*. 2019: 432. DOI: 10.1016/B978-0-12-815799-2.00001-0.
2. Гаи А. Качество на этапе разработки – Quality by Design (QbD) для вспомогательных веществ. *Фармацевтическая отрасль*. 2012; 3(32): 28–30.
3. Kishore K., Surendra M. Reliability analysis with Minitab. *CRC Press*. 2016: 90–101. DOI: 10.1201/b19630-X.
4. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ. Множественная регрессия. *Applied Regression Analysis. Диалектика*. 2007: 912.
5. Радченко С. Г. Методология регрессионного анализа: Монография. *Корнийчук*. 2011: 376.

REFERENCES

1. Sarwar B., Hasnain M. S. Pharmaceutical Quality by design Principles and applications. *Academic Press*. 2019: 432. DOI: 10.1016/B978-0-12-815799-2.00001-0.
2. Gay A. Quality at the development stage – Quality by Design (QbD) for excipients. *Pharmaceutical industry*. 2012; 3(32): 28–30 (in Russ.).
3. Kishore K., Surendra M. Reliability analysis with Minitab. *CRC Press*. 2016: 90–101. DOI: 10.1201/b19630-X.
4. Dreyper N., Smith G. Applied regression analysis. Multiple regression. *Applied Regression Analysis. Dialectics*. 2007: 912 (in Russ.).
5. Radchenko S. G. Methodology of regression analysis: Monograph. *Korniyuchuk*. 2011: 376 (in Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-49-55>
УДК 615.451.16



Оригинальная статья/Research article

Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного

С. С. Белокуров^{1**}, Е. В. Флисюк¹, И. А. Наркевич¹, В. Г. Лужанин^{1*}, С. В. Шилов², К. О. Новикова¹

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, лит. А
² – ООО «Технологии без границ» РФ Россия, 659315, Алтайский край, г. Бийск, ул. Социалистическая, д. 98

*Контактное лицо: Лужанин Владимир Геннадьевич. E-mail: vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

**Контактное лицо: Белокуров Сергей Сергеевич. E-mail: sergei.belokurov@pharminnotech.com

Статья получена: 18.07.2019. Статья принята к печати: 20.08.2019

Резюме

Введение. К перспективным технологиям, с помощью которых можно получать экстракты с высоким содержанием БАВ относятся ультразвуковая, виброкавитационная и сверхкритическая флюидная CO₂ экстракции. Растительные экстракты с высоким содержанием биологически активных веществ не оказывают вредного воздействия на организм человека, легко включаются в обменные процессы и практически не имеют побочных эффектов, кроме этого они безопасны для окружающей среды, поэтому представляют особый интерес для фармацевтической и пищевой промышленности. Данные технологии сегодня широко применяют при производстве галеновых препаратов, для получения различных экстрактов и масел в косметологии, а также в производстве природных красителей и отдушек и т.д.

Цель. выбор оптимального метода экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ из семян пажитника сенного.

Материалы и методы. Получение виброкавитационного экстракта проводили на экспериментальной виброкавитационной установке, изготовленной на кафедре процессов и аппаратов Санкт-Петербургского государственного Технологического института. Экстракты получали при температуре 60±2 °С. Частота оборотов гомогенизатора варьировалась от 1000 до 5000 об/мин.

Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой установки И100-6/4. Ультразвуковое воздействие на твердое растительное сырье проводили с интенсивностью 22 кВт в течение 60 мин. Время экстрагирования в виброкавитационном экстракторе-гомогенизаторе изучали для подбора оптимальных значений. Сверхкритическую флюидную CO₂ экстракцию проводили в двух вариантах с использованием соэкстрагента (96% этанола в соотношении диоксид углерода: этанол 9:1) и без него. Экстрагирование проводили на сверхкритической флюидной экстракционной системе с сосудом 1 л SFE1000-2-BASE с комплектом для модернизации системы SFE1000-2-BASE до системы SFE1000M1-2-FMC50 (Waters, USA). Скорость потока экстрагента составляла 60 г/мин. Экстракцию проводили в течение одного часа и давлении 200, 300 и 400 бар. Экстракцию проводили трижды. В полученных извлечениях определяли сумму экстрактивных веществ согласно ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Количественное определение сапонинового комплекса семян пажитника сенного проводили на хроматографе Agilent QTOF-6530 с двумя источниками ионизации ESI и APCI согласно методике Гравель и др. [9]

Результаты и обсуждение. Проведенные исследования позволили определить количество экстрактивных веществ в семенах пажитника сенного и выбрать наиболее перспективный метод экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ.

Заключение. В результате наших исследований было установлено, что наиболее перспективным методом экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного является виброкавитационная экстракция при частоте оборотов гомогенизатора 5000 об/мин и времени экстрагирования 60 мин.

Ключевые слова: экстрагирование, экстракты, виброкавитационная экстракция, ультразвуковая экстракция, сверхкритическая флюидная CO₂ экстракция, пажитник сенной, ВЭЖХ-МС.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич, В. Г. Лужанин и С. В. Шилов придумали и разработали эксперимент. С. С. Белокуров и К. О. Новикова провели эксперименты по экстрагированию и определению суммы экстрактивных веществ. С. С. Белокуров провел количественное определение сапонинов. Авторы С. С. Белокуров и Е. В. Флисюк и К. О. Новикова участвовали в обработке данных. Авторы С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич, В. Г. Лужанин и С. В. Шилов участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., Лужанин В. Г., Шилов С. В., Новикова К. О. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 49–55.

Comparative Analysis of Perspective Extragation Methods for Receiving Extractions from Fenugreek Seeds

Sergey S. Belokurov^{1**}, Elena V. Flisyuk¹, Igor A. Narkevich¹, Vladimir G. Luzhanin^{1*}, Sergey V. Shilov², Kseniya O. Novikova¹

¹ – St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia
² – LLC «Technologies without Borders», 98, Socialisticheskaya str., Biysk, Altai Territory, 659315, Russia

*Corresponding author: Vladimir G. Luzhanin. E-mail: vladimir.luzhanin@pharminnotech.com

**Corresponding author: Sergey S. Belokurov. E-mail: sergei.belokurov@pharminnotech.com

Received: 18.07.2019. Accepted: 20.08.2019

Abstract

Introduction. Today, innovative technologies are widely used in pharmacology (in particular, in the production of herbal preparations), in cosmetology (obtaining various extracts and oils, complex preparations), as well as in the food industry (as natural dyes, etc.). Plant extracts with a high level of risk do not have a harmful effect on the human body, except that they provide environmental safety, which creates a special interest for the pharmaceutical industry. vibrocavitation and supercritical fluid CO₂ extraction.

Aim. The choice of the optimal level of extraction to obtain a high level of fenugreek seeds.

© Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., Лужанин В. Г., Шилов С. В., Новикова К. О., 2019

© Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., Luzhanin V. G., Shilov S. V., Novikova K. O., 2019

Materials and methods. Obtaining a vibrocavitation extract with an experimental vibration-explosive installation made at the Department of Processes and Apparatus of the St. Petersburg State Technology Institute. Extracts at a temperature of 60 ± 2 °C. The frequency of revolutions of the homogenizer ranged from 1000 to 5000 rpm. Ultrasonic impact using ultrasound unit I100-6/4 Ultrasonic effect on solid plant material with an intensity of 22 kHz for 60 minutes. The time of extraction in a vibro-cavitation extractor-homogenizer was studied for optimal values.

Supercritical fluid CO₂-extraction is obtained in two versions with the use of extragent (96% ethanol in the presence of carbon dioxide: ethanol 9: 1) and without it. Extraction of the sound of a supercritical fluid extraction system with a 1-liter vessel. SFE1000-2-BASE with a kit for upgrading the SFE1000-2-BASE system to an SFE1000M1-2-FMC50 system (Waters, USA). The flow rate of the extractant was 60 g/min. Emergency listening for one hour and pressure 200, 300 and 400 bar. Extraction is observed three times. The obtained extracts indicate the amount of extractive substances according to article of Russian state pharmacopoeia 1.5.3.0006.15 «Determination of the content of extractive substances in plant raw materials and medicinal plant preparations». Quantitative determination of the saponin complex of parasitic seed seeds on an Agilent QTOF-6530 chromatograph with two ESI and APCI ionization sources according to Gravel et al.

Results and discussion. Studies have allowed to determine the amount of extractives in the seeds and choose the most promising method.

Conclusion. As a result of our research, it was found that the most promising extraction method for extracting seeds is a parasitic with vibration extraction at frequent revolutions of the homogenizer of 5000 rpm and an extraction time of 60 minutes.

Keywords: extraction, extract, vibration extraction, ultrasonic extraction, supercritical fluid extraction of CO₂, fenugreek hay, HPLC-MS.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk, Igor A. Narkevich, Vladimir G. Lujanin and Sergey V. Shilov invented and developed the experiment. Sergey S. Belokurov and Ksenia O. Novikova conducted experiments on extraction and determination of the amount of extractive substances. Sergey S. Belokurov quantified saponins. Authors Sergey S. Belokurov and Elena V. Flisyuk and Ksenia O. Novikova participated in data processing. Authors Sergey S. Belokurov, Elena V. Flisyuk Igor A. Narkevich, Vladimir G. Lujanin and Sergey V. Shilov participated in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., Luzhanin V. G., Shilov S. V., Novikova K. O. Comparative analysis of perspective extragation methods for receiving extractions from fenugreek seeds. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 49–55.

ВВЕДЕНИЕ

К перспективным технологиям, с помощью которых можно получать экстракты с высоким содержанием БАВ относятся ультразвуковая, виброкавитационная и сверхкритическая флюидная CO₂ экстракции. Растительные экстракты с высоким содержанием биологически активных веществ не оказывают вредного воздействия на организм человека, легко включаются в обменные процессы и практически не имеют побочных эффектов, кроме этого они безопасны для окружающей среды, поэтому представляют особый интерес для фармацевтической и пищевой промышленности [1] Данные технологии сегодня широко применяют при производстве галеновых препаратов, для получения различных экстрактов и масел в косметологии, а также в производстве природных красителей и отдушек и т.д.

Одним из наиболее распространенных методов, который используется для извлечения биологически активных веществ из растительного сырья является ультразвуковая экстракция. Известно, что на коэффициент внутренней диффузии большое влияние оказывает ультразвук. Возможность варьировать мощность ультразвукового поля при экстрагировании растительного сырья позволяет регулировать скорость диффузии веществ из клеток, что имеет большое значение для фармацевтической практики.

Виброкавитационный метод экстракции схож с ультразвуковым методом экстрагирования, но для его проведения необходима специальная жидкая среда. Кроме того, для этого метода требуется пробоподготовка (обязательное измельчение лекарственного растительного сырья). В виброкавитационном мето-

де перед обработкой ультразвуком делают эмульсию в виброкавитационном гомогенизаторе (что, в принципе, и есть виброкавитационная мельница, которая измельчает сырье до размера <1 мкм). Преимущества данного метода: сокращает время экстрагирования до 15–30 мин и обладает высокой эффективностью извлечения.[5]

Экстракция при особых условиях, выше критических параметров температуры и давления, когда вещество имеет агрегатное состояние по свойствам схожее одновременно и с жидкостью и с газом, является прекрасной альтернативой обычным методам жидкостной экстракции и успешно применяется в настоящее время. В науке такое состояние называют «сверхкритическим флюидом». Значения температуры и давления в критической точке индивидуальны для каждого компонента. При достижении таких условий граница раздела фаз пропадает и возникает единая плотная, безобъемная среда. В таком состоянии вещество растворяет твердые компоненты как жидкость и подобно газу легко диффундирует и проникает глубоко в материал. Кроме этого, вещества в состоянии выше критического имеют низкую вязкость, плотность, которую можно легко варьировать, просто изменяя давление и температуру. [6]. Так как отсутствует какое-либо взаимодействие на границе раздела фаз, такие вещества могут проникать глубоко в клетки и поры, что способствует более быстрому проникновению флюида в матрицу сырья и ускоряет процесс извлечения. Не маловажным является то, что можно управлять растворяющей способностью флюида. Это позволяет контролировать избирательность экстрагирования, не меняя сам растворитель. Поэ-

тому такие вещества нашли широкое применение в промышленных и лабораторных процессах, заменяя классические растворители.

Объектом нашего исследования были выбраны извлечения из семян пажитника сенного (лат. *Trigonella foenum-graecum* сем. Fabaceae), полученные различными методами экстракции. Семена пажитника сенного часто использовались в лечебных целях еще с давних времен. Так в древней индийской традиционной системе народной медицины – Аюрведа, семена пажитника были предложены как средство для лечения различных заболеваний пищеварительной системы. По данным литературы [2], семена пажитника традиционно использовались как ветрогонное, слабительное, отхаркивающее средство, и применялись для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта. Отвары из семян пажитника применяли при повышении температуры тела, боли в горле, при ранах и язвах, опухание желез, раздражение кожи, бронхите и диабете. В XX веке (в начале-конце 1960-х годов) из-за широкого распространения и использования полезных свойств пажитника были предприняты многие исследования по изучению его потенциального применения в медицине, в результате которых были выявлены различные положительные эффекты экстрактов семян пажитника на экспериментальных животных [3].

Целью настоящего исследования явился выбор оптимального метода экстрагирования для получения извлечений с высоким содержанием БАВ из семян пажитника сенного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Товароведческий анализ семян пажитника сенного, экотип Марокко, приобретенных в фирме Фитокаса г. Касабланка (Марокко), которые мы использовали для исследования, показал соответствие сырья требованиям ГФ XIV издания [7].

Получение вибро-кавитационного экстракта проводили на экспериментальной вибро-кавитационной установке (рисунок 1) [8]. Экстракты получали при тем-



Рисунок 1. Виброкавитационный экстрактор

Figure 1. Vibro-cavitation extractor

пературе 60 ± 2 °C. Частота оборотов гомогенизатора варьировалась от 1000 до 5000 об/мин.

Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой установки И100-6/4 («Ультразвуковая техника Инлаб», г. Санкт-Петербург, Россия). (рисунок 2) Ультразвуковое воздействие на твердое растительное сырье проводили с интенсивностью 22 кГц в течение 30–60 мин. Время экстрагирования в виброкавитационном экстракторе-гомогенизаторе изучали для подбора оптимальных значений.



Рисунок 2. Ультразвуковая установка И100-6/4

Figure 2. Ultrasonic device I100-6/4

В качестве экстрагентов (в обоих случаях) использовали воду очищенную и растворы этанола в различной концентрации от 40 до 90%. Соотношение сырье : экстрагент составляло 1:20 (по массе). [9]

Сверхкритическую флюидную CO_2 экстракцию проводили в двух вариантах с использованием со-экстрагента (96% этанола в соотношении диоксид углерода : этанол 9:1) и без него. Экстрагирование проводили на сверхкритической флюидной экстракционной системе с сосудом 1 л SFE1000-2-BASE с комплектом для модернизации системы SFE1000-2-BASE до системы SFE1000M1-2-FMC50 (Waters, USA). Скорость потока экстрагента составляла 60 г/мин. Экстракцию проводили в течение одного часа и давлении 200, 300 и 400 бар. Экстракцию проводили трижды.

Для повышения выхода экстрагируемых веществ оптимизировали параметры для ультразвуковой кавитации: частоту колебаний, температуру и продолжительность экстракции; для виброкавитационной экстракции: скорость вращения гомогенизатора; для сверхкритической флюидной CO_2 экстракции: наличие со-экстрагента, давление и продолжительность экстракции.

Затем в полученных извлечениях определяли сумму экстрактивных веществ согласно ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Извлечения тщательно взбалтывали и фильтровали через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150–200 см³, 25 см³. Фильтрат пипеткой пе-

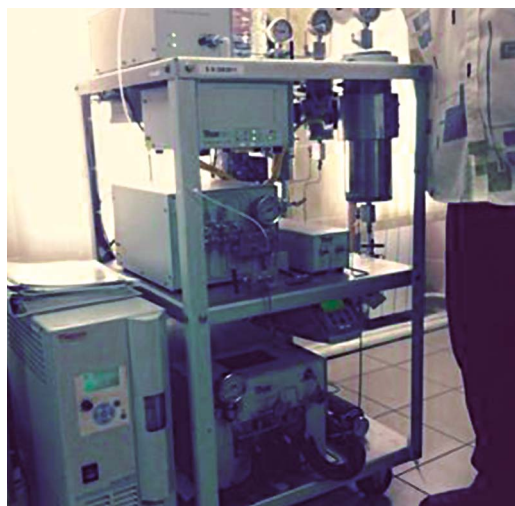


Рисунок 3. Сверхкритическая флюидная экстракционная система

Figure 3. Supercritical fluid extraction system

реносили в предварительно высушенную при температуре 100–105 °С до постоянной массы, и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7–9 см, и выпаривали на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушили при температуре 100–105 °С до постоянной массы, затем охлаждали в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находился кальция хлорид безводный, и немедленно взвешивали [7].

Содержание экстрактивных веществ в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{m \times 200 \times 100}{m_1(100 - W)}, \quad (1)$$

Таблица 1. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени ультразвуковой экстракции

Table 1. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of ultrasonic extraction

	вода	40% этанол	50% этанол	60% этанол	70% этанол	80% этанол	90% этанол
10 мин	0	0,39±0,04	0,51±0,06	0,63±0,05	0,71±0,03	0,65±0,02	0,57±0,06
20 мин	0	0,58±0,03	0,79±0,09	0,91±0,1	0,98±0,07	0,77±0,06	0,71±0,04
30 мин	0	0,86±0,06	1,08±0,13	1,17±0,07	1,32±0,12	1,06±0,11	0,99±0,12
40 мин	0	1,10±0,12	1,21±0,1	1,33±0,12	1,57±0,14	1,23±0,08	1,19±0,11
50 мин	0,001	1,22±0,09	1,38±0,09	1,62±0,15	1,73±0,20	1,67±0,13	1,49±0,12
60 мин	0	1,01±0,02	1,17±0,11	1,49±0,12	1,41±0,09	1,33±0,10	1,29±0,05

Таблица 2. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени виброкавитационной экстракции при скорости вращения гомогенизатора 1000 об/мин

Table 2. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of vibro-cavitation extraction at the speed of rotation of the homogenizer 1000 rpm

	вода	40% этанол	50% этанол	60% этанол	70% этанол	80% этанол	90% этанол
10 мин	0	0,06±0,001	0,13±0,001	0,29±0,03	0,43±0,05	0,38±0,04	0,34±0,02
20 мин	0	0,11±0,002	0,26±0,005	0,37±0,02	0,51±0,04	0,47±0,05	0,43±0,04
30 мин	0	0,16±0,001	0,31±0,008	0,54±0,06	0,65±0,08	0,54±0,04	0,51±0,03
40 мин	0	0,23±0,01	0,39±0,03	0,78±0,09	0,83±0,01	0,67±0,05	0,59±0,05
50 мин	0	0,28±0,02	0,48±0,02	0,86±0,10	0,91±0,08	0,75±0,07	0,68±0,07
60 мин	0,001	0,34±0,03	0,56±0,04	0,97±0,09	1,1±0,2	0,83±0,09	0,72±0,04

где m – масса сухого остатка, в граммах; m_1 – масса сырья, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Потерю в массе при высушивании сырья (W) в процентах определяли по формуле 2:

$$X = \frac{(m - m_1) \times 100}{m}, \quad (2)$$

где m – масса сырья до высушивания, в граммах; m_1 – масса сырья после высушивания, в граммах.

Количественное определение сапонинового комплекса семян пажитника сеного проводили на хроматографе Agilent QTOF-6530 с двумя источниками ионизации ESI и APCI (Agilent США).

Параметры хроматографа: Предколонка «Security Guard C18» (4 × 3 мм; «Phenomenex», США), температура колонки 25 °С, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл, подвижная фаза: ацетонитрил : вода в различных соотношениях; время хроматографирования 42 мин

Параметры детектора: Режим сканирования ионов – положительные ионы, диапазон масс сканируемых ионов от 400 до 1500 m/z ; давление небулайзера

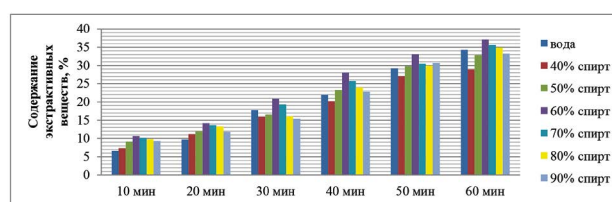


Рисунок 4. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ от времени ультразвукового воздействия

Figure 4. The dependence of the concentration of the extracted substances on the time of ultrasound exposure

70 psi; скорость и температура газа-осушителя составляли соответственно 12 л/мин и 350 °С.

Разделение компонентов смеси проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus-C18 Rapid Resolution HD 2.1 × 50 mm (Agilent США).

В качестве стандартного образца использовали диосцин (≥95% HPLC Sigma-Aldrich) [10].

Количественное содержание диосцина проводили методом калибровочной прямой.

Статистическую обработку результатов проводили, используя коэффициент Стьюдента. Доверительный интервал 0,95. Полученные данные представлены на рисунках 4–6 и в таблицах 1–6.

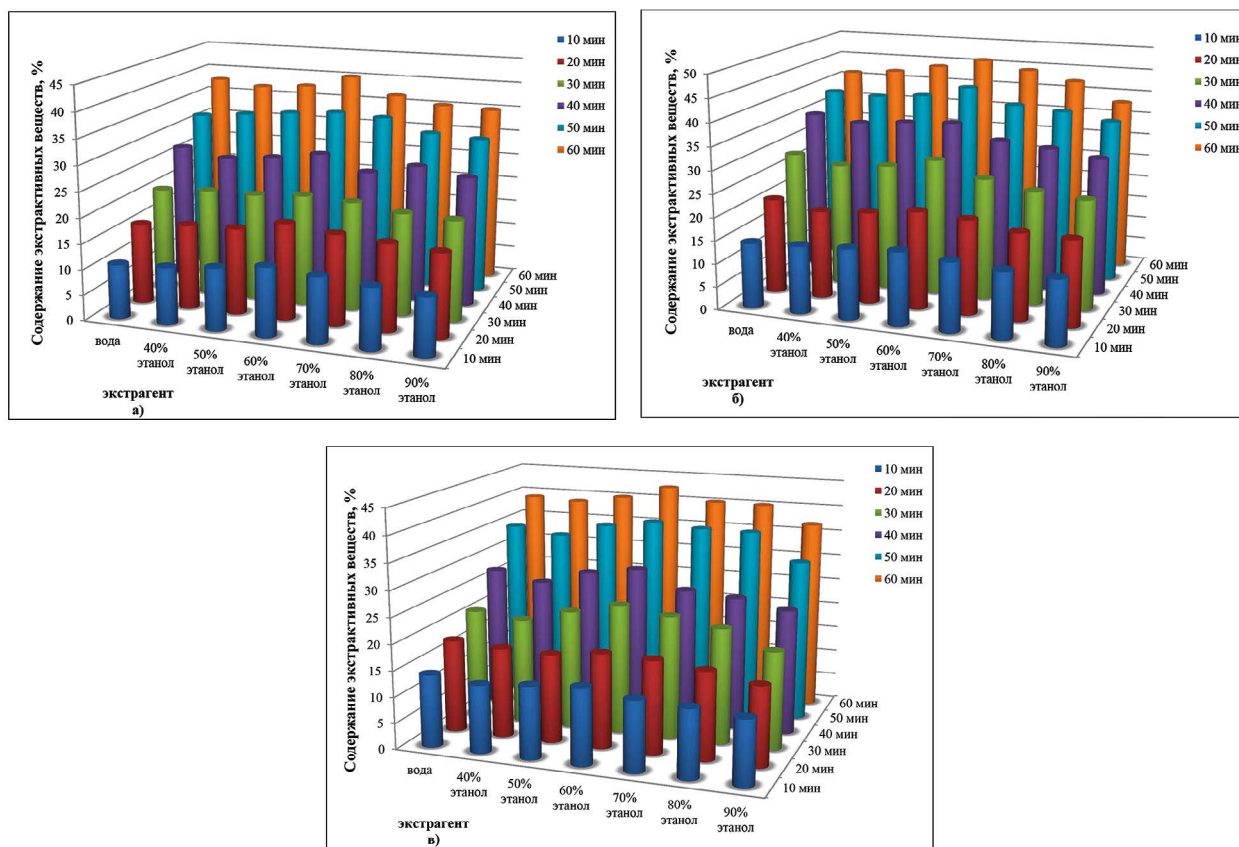


Рисунок 5. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ от скорости оборотов гомогенизатора

а – скорость вращения гомогенизатора 1000 об/мин; б – скорость вращения гомогенизатора 3000 об/мин; в – скорость вращения гомогенизатора 5000 об/мин

Figure 5. The dependence of the concentration of extractives on the speed of rotation of the homogenizer

а – the speed of rotation of the homogenizer 1000 rpm; б – the speed of rotation of the homogenizer 3000 rpm; в – the speed of rotation of the homogenizer 5000 rpm

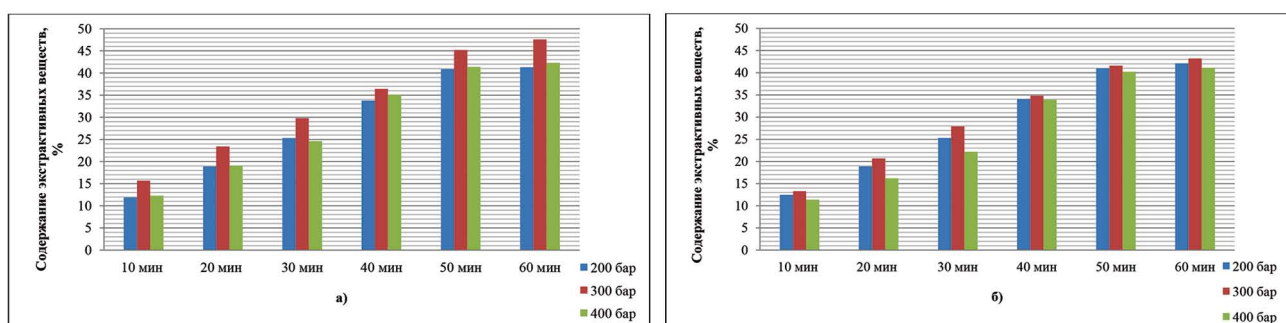


Рисунок 6. Зависимость концентрации экстрагируемых веществ от времени экстрагирования сверхкритическим CO₂

а – сверхкритический флюидный CO₂: 96% этанол 9:1; б – сверхкритический флюидный CO₂ – 100%

Paint 6. The dependence of the concentration of extractives on the time of extraction of supercritical CO₂

а – supercritical fluid CO₂: 96% ethanol 9:1; б – supercritical fluid CO₂ – 100%

Таблица 3. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени виброкавитационной экстракции при скорости вращения гомогенизатора 3000 об/мин

Table 3. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of vibro-cavitation extraction at the speed of rotation of the homogenizer 3000 rpm

	вода	40% этанол	50% этанол	60% этанол	70% этанол	80% этанол	90% этанол
10 мин	0	0,37±0,02	0,48±0,01	0,57±0,07	0,67±0,04	0,60±0,03	0,56±0,06
20 мин	0	0,46±0,02	0,65±0,03	0,78±0,05	0,89±0,09	0,75±0,06	0,69±0,05
30 мин	0	0,69±0,06	0,89±0,09	0,99±0,11	1,12±0,10	0,94±0,14	0,87±0,08
40 мин	0	0,98±0,07	1,03±0,07	1,28±0,12	1,43±0,13	1,17±0,11	1,02±0,11
50 мин	0	1,11±0,09	1,19±0,10	1,44±0,20	1,64±0,15	1,37±0,15	1,28±0,09
60 мин	0,001	1,25±0,14	1,36±0,11	1,64±0,11	1,87±0,17	1,52±0,13	1,44±0,11

Таблица 4. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени виброкавитационной экстракции при скорости вращения гомогенизатора 5000 об/мин

Table 4. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of vibro-cavitation extraction at the speed of rotation of the homogenizer 5000 rpm

	Вода	40% этанол	50% этанол	60% этанол	70% этанол	80% этанол	90% этанол
10 мин	0	0,57±0,03	0,67±0,02	0,74±0,09	0,83±0,07	0,79±0,08	0,75±0,05
20 мин	0	0,67±0,05	0,78±0,09	0,93±0,07	1,26±0,13	0,99±0,06	1,03±0,08
30 мин	0	0,83±0,09	0,97±0,07	1,22±0,09	1,49±0,17	1,24±0,09	1,29±0,14
40 мин	0,001	1,01±0,12	1,11±0,10	1,49±0,16	1,67±0,15	1,43±0,14	1,45±0,11
50 мин	0,003	1,19±0,10	1,34±0,14	1,60±0,15	1,89±0,14	1,67±0,13	1,59±0,12
60 мин	0,003	1,31±0,09	1,49±0,13	1,83±0,17	2,03±0,19	1,94±0,21	1,87±0,13

Таблица 5. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени сверхкритической флюидной CO₂ экстракции (этанол 96%; CO₂ 1:9)

Table 5. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of supercritical fluid CO₂ extraction (ethanol 96%; CO₂ 1: 9)

	200 бар	300 бар	400 бар
10 мин	0,84±0,06	0,98±0,05	0,89±0,09
20 мин	0,99±0,05	1,14±0,07	1,02±0,03
30 мин	1,09±0,09	1,39±0,16	1,29±0,08
40 мин	1,21±0,11	1,61±0,11	1,47±0,13
50 мин	1,33±0,14	1,77±0,09	1,53±0,14
60 мин	1,46±0,12	1,89±0,17	1,61±0,12

Таблица 6. Зависимость концентрации (%) диосцина от времени сверхкритической флюидной CO₂ экстракции (100% CO₂)

Table 6. Dependence of the concentration (%) of dioscin on the time of supercritical fluid CO₂ extraction (100% CO₂)

	200 бар	300 бар	400 бар
10 мин	0,61±0,02	0,87±0,09	0,74±0,05
20 мин	0,89±0,05	1,10±0,07	0,97±0,08
30 мин	1,07±0,08	1,22±0,10	1,11±0,12
40 мин	1,19±0,10	1,46±0,13	1,28±0,11
50 мин	1,27±0,08	1,53±0,11	1,39±0,13
60 мин	1,39±0,13	1,60±0,17	1,47±0,15

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При ультразвуковой экстракции в системе «твердое тело-жидкость» основной механизм включает разрушение структуры поверхности, диффузию, капиллярные звуковые эффекты и акустические микро-вихри, прохождение через мембраны клеток и локальные тепловые эффекты [4]. В связи с этим возможно разрушение целевых биологически активных веществ,

каким и является диосцин. На рисунке 4 и 7, представленных в статье, отражено, снижение выхода диосцина после 50 минут экстракции. При этом выход экстрактивных веществ продолжает расти и к 60 минуте достигает максимума. Наибольший выход диосцина наблюдался при времени экстрагирования 50 минут и частоте ультразвука 22 кГц. Дальнейшее увеличение продолжительности и интенсивности обработки сырья ультразвуком (более 1 час и 22 кГц) не приводит к увеличению содержания БАВ в экстракте, а напротив вызывает их разрушение и инактивацию [4]. При использовании других методов экстрагирования разрушения действующих веществ не наблюдалось. В результате проведения сверхкритической флюидной CO₂ экстракции было установлено, что наибольший выход экстрактивных веществ и диосцина получен при использовании соэкстрагента, давлении 300 бар и времени экстракции 60 минут. Это может быть связано с тем, что сырье содержит большое количество липофильных и амфифильных соединений (липиды, белки, спонины и др.) для которых давление 200 бар является селективным. Так же в связи использованием этанола – полярного соэкстрагента, увеличивается диапазон выхода экстрактивных веществ. Виброкавитационная экстракция так же показала высокий выход экстрактивных веществ сопоставимый с выходом при использовании сверхкритической флюидной CO₂ экстракции (рисунок 6 и таблицы 5, 6). Однако, при использовании данного метода экстрагирования оказывается определенное ультразвуковое воздействие на сырье, так как основной механизм экстрагирования виброкавитационного гомогенизатора заключается в получении тонкодисперсной эмульсии при обработке сырья в течение короткого времени. В результате извлечения являются гетерогенными системами, в зонах

сжатия и разрежения возникает давление. Избыточное давление, накладываясь на постоянное гидравлическое давление, суммарно может составлять несколько атмосфер. В фазу разрежения во всем объеме жидкости, особенно у границ раздела фаз, в местах, где имеются пузырьки газа или мельчайшие твердые частицы, образуются полости, кавитационные пузырьки. При повторном сжатии эти пузырьки захлопываются, развивая давление до сотен атмосфер. Образуется ударная волна высокой интенсивности, которая приводит к механическому разрушению твердых частиц и вырывает с поверхности раздела фаз небольшие объемы жидкости, распадающиеся на мелкие капельки и снова входящие в неё. При этом мощность затрачиваемая на перемешивание и образование эмульсии при постоянной частоте вращения с течением времени уменьшается до 50%, а с увеличением концентрации влаги в сырье растёт до 30% [5]. Так же, следует отметить, что виброкавитационные гомогенизаторы достаточно дешёвые в сравнении с сверхкритическими флюидными экстракционными системами, что является несомненным преимуществом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате наших исследований было выявлено, что наиболее перспективным методом экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного является виброкавитационная экстракция при частоте оборотов гомогенизатора 5000 об/мин и времени экстрагирования 60 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белокуров С. С., Флисюк Е. В. Сравнительный анализ различных методик для получения экстрактов с высоким содержанием биологически активных веществ. VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург, 23–24 апреля 2018 г. – СПб.: Изд-во СПбХФУ. 2018: 383–384.
2. Abdo M. S., Al-Kafawi A. A. Experimental studies on the effect of *Trigonella foenum-graecum*. *Planta Med.* 1969; 17: 14–18.
3. Grover J. K. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81(1): 81–100.
4. Хмелев В. Н., Сливин А. Н., Барсуков Р. В., Цыганок С. Н., Шалуннов А. В. Применение ультразвука высокой интенсивности в промышленности. Изд-во: Алт. гос. техн. ун-та. 2010: 203.
5. Белокуров С. С., Наркевич И. А., Флисюк Е. В., Каухова И. Е., Ароян М. В. Современные методы экстрагирования лекарственного растительного сырья (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2019; 56(6): 45–50.
6. Kar L. N., Chin P. T., Roselina K., Oi M. L., Kamariah L., Mana Y. C. Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO₂). *Food Chemistry*. 2010; 119: 1278–1283.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2 / МЗРФ. М., 2018: 7019 с.
8. Пименов Ю. А. Виброкавитационный смеситель-гомогенизатор: пат. – 2131761 Рос. Федерация; рег. № 98105553/25; заявл. 25.03.1998; опубл. 20.06.1999.
9. Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Смахова И. Е. Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного с высоким содержанием биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 21–25.
10. Гравель И. В., Скибина А. А., Кузьменко А. Н., Демина Н. Б. Изучение химического состава корней спаржи кистевидной. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2017; 58(4): 199–203.

REFERENCES

1. Belokurov S. S., Flisyuk E. V. Comparative analysis of various methods for obtaining extracts with a high content of biologically active substances. VIII All-Russian Scientific Conference of Students and Postgraduates with International Participation «Young Pharmacy – Potential of the Future», St. Petersburg, April 23–24, 2018 – St. Petersburg: SPCPU Publishing House. 2018: 383–384 (in Russ.).
2. Abdo M. S., Al-Kafawi A. A. Experimental studies on the effect of *Trigonella foenum-graecum*. *Planta Med.* 1969; 17: 14–18.
3. Grover J. K. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81(1): 81–100.
4. Khmelev V. N., Slivin A. N., Barsukov R. V., Tsyganok S. N., Shalunov A. V. The use of high-intensity ultrasound in industry. *Publishing house Alt. state tech. University*. 2010: 203 (in Russ.).
5. Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Kaikhova I. E., Aroyan M. V. Modern methods of extraction of medicinal plant materials (review). *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2019; 56(6): 45–50 (in Russ.).
6. Kar L. N., Chin P. T., Roselina K., Oi M. L., Kamariah L., Mana Y. C. Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO₂). *Food Chemistry*. 2010; 119: 1278–1283.
7. Gosudarstvennaya farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIV izd. T. 2 / MZ RF. M., 2018: 7019 p. (in Russ.).
8. Pimenov Yu. A. Vibro-cavitation mixer-homogenizer: Pat. – 2131761 Rus. Federation; reg. № 98105553.25; declared 03.25.1998; publ. 06.20.1999 (in Russ.).
9. Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Smekhova I. E. The choice of the method of extraction to obtain extracts from the seeds of fenugreek hay with a high content of biologically active substances. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 21–25 (in Russ.).
10. Gravel I. V., Skibina A. A., Kuzmenko A. N., Demina N. B. Study of the chemical composition of asparagus racemes. *Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 2. Chemistry*. 2017; 58(4): 199–203 (in Russ.).



Трехдневный Саммит PHARMASTRATEGIES 2020

II Международная конференция «Что происходит на рынке медизделий?», 2 октября

Площадка для эффективного диалога ведущих игроков рынка медизделий России и СНГ с участием регуляторов рынка и профессионального сообщества

XI Международная конференция «Что происходит на фармацевтическом рынке?», 3 октября

Главное место встречи всего фармсообщества для обсуждения текущего состояния рынка и совместной разработки стратегии развития на следующий год

XIII Аптечный саммит «Развитие фармацевтического ритейла в России и СНГ», 4 октября

Обмен опытом и мнениями представителей крупнейших аптечных сетей, фармацевтических производственных и дистрибьюторских компаний по ключевым отраслевым вопросам

Присоединяйтесь!

www.infor-media.ru

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-57-61>
УДК 615.013



Оригинальная статья/Research article

Изучение некоторых параметров фармакокинетики фенола, входящего в состав пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции

В. И. Ноздрин¹, Г. А. Пьявченко^{1,2*}, М. Е. Иванова¹, К. С. Гузев¹, С. Л. Кузнецов²

1 – АО «Ретиноиды», Россия, 111123, Москва, ул. Плеханова, д. 4

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

*Контактное лицо: Пьявченко Геннадий Александрович. E-mail: gennadii.piavchenko@yandex.ru

Статья получена: 03.07.2019. Статья принята к печати: 21.08.2019

Резюме

Введение. Антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции (АСД-3) представляет собой многокомпонентную субстанцию, получаемую путём термической переработки мясокостной массы крупного рогатого скота, которая содержит в своём составе более 120 веществ, в том числе биологически активных. В числе компонентов, содержащихся в достаточной для количественного анализа мере в составе АСД-3, наибольшие концентрации отмечены для пиррола, фенола, крезола и его производных, и индола. Несмотря на то, что антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции был получен более полувека назад, до настоящего времени сведения о фармакокинетике компонентов препарата отсутствуют. Одним из предпочтительных веществ для исследования ФК является фенол, поскольку он является субстанцией и применяется в фармацевтической технологии при изготовлении лекарственных средств.

Цель. Изучение некоторых параметров фармакокинетики фенола как компонента препарата, содержащего антисептик-стимулятор Дорогова 3 фракции в дозировке 0,5 г/кг, при однократном применении в сыворотке крови 84 крыс-самок массой тела 100–120 г.

Материалы и методы. Первой группе животных вводили внутривенно водную эмульсию, а второй – на кожу наносили цинковую пасту, содержащие 5% АСД-3. После введения эмульсии или аппликации пасты животных выводили из эксперимента через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 6 и 8 часов с дальнейшим забором крови из брюшной аорты в центрифужные пробирки. Исследование проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждения. Константа скорости элиминации при внутривенном введении равняется 0,0968 ч⁻¹, а при накожном нанесении препарата – 0,0581 ч⁻¹. Период полувыведения фенола в первом случае равняется 7,2 ч, а во втором случае – 11,9 ч, а его относительная биодоступность из пасты, содержащей 5% АСД 3 фракции составляет 14,38% от 5% эмульсии, введённой в организм крыс внутривенно.

Заключение. Накожное нанесение препарата, содержащего 5% АСД 3 фракции, обеспечивает в 10 раз меньшее содержание фенола в крови в сравнении с внутривенным введением. Через 15 минут после накожного нанесения компоненты препарата начинают обнаруживаться в сыворотке крови, достигая своей максимальной концентрации через 1,5–2 часа, в дальнейшем постепенно снижаясь.

Ключевые слова: АСД 3 фракции, фенол, многокомпонентная субстанция, экспериментальная фармакокинетика, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы В. И. Ноздрин и К. С. Гузев спланировали эксперимент, автор Г. А. Пьявченко осуществил забор крови для исследования. М. Е. Иванова провела исследование плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Авторы К. С. Гузев и Г. А. Пьявченко участвовали в обработке данных. Авторы К. С. Гузев и М. Е. Иванова проводили теоретические расчеты. Авторы Г. А. Пьявченко, В. И. Ноздрин и С. Л. Кузнецов участвовали в трактовке полученных данных и написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Ноздрин В. И., Пьявченко Г. А., Иванова М. Е., Гузев К. С., Кузнецов С. Л. Изучение некоторых параметров фармакокинетики фенола, входящего в состав пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 57–61.

Evaluation of Pharmacokinetical Parameters of Phenol, a Component of Antiseptic Dorogov's stimulator 3 Fraction Paste

Vladimir I. Nozdrin¹, Gennadii A. Piavchenko^{1,2}, Margarita E. Ivanova¹, Konstantin S. Guzev¹, Sergey L. Kuznetsov²

1 – JSC «Retinoids», 4, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Department of Histology, Cytology and Embryology, 11, Mokhovaya str., Moscow, 103009, Russia

*Corresponding author: Gennadii A. Piavchenko. E-mail: gennadii.piavchenko@yandex.ru

Received: 03.07.2019. Accepted: 21.08.2019

Abstract

Introduction. Antiseptic Dorogov's stimulator 3rd fraction (ASD-3) is a multicomponent substance, which is obtained by the thermal processing of cattle-origin tissues, which contains more than 120 substances, including biologically active substances. Among the components of ASD-3, necessary for quantitative analysis, pyrrole, phenol, cresol and its derivatives, and indole are distinguished as components. Despite the fact that antiseptic Dorogov's stimulator 3rd fraction was discovered more than half a century ago, there is no information about the pharmacokinetics of the drug components to date. Phenol is one of the preferred substances for research because that is a substance applied in the pharmaceutical technology for the manufacture of medicines.

Aim. Study of pharmacokinetic parameters of phenol as a component of a drug containing an antiseptic Dorogov's stimulator 3rd fraction in a dose of 0.5 g/kg, with a single use in a blood serum of 84 female rats weighing 100–120 g.

Materials and methods. In the blood serum of the 84 female Wistar rats weighing 100–120 g a study of a phenol pharmacokinetics as a component of ASD-3 drug in a dose of 0.5 g/kg was performed by a single skin application. The first group of animals was intraperitoneally injected with an

aqueous emulsion containing 5% ASD-3, while the second one received zinc paste containing 5% ASD-3 on a skin surface. After the application of the emulsion or paste, the animals were euthanized after 0.25; 0.5; 1; 1.5; 2; 6 and 8 hours with further collection of blood from the abdominal aorta into centrifuge tubes. The study was carried out by high performance liquid chromatography.

Results and discussion. The elimination rate constant for intraperitoneal drug emulsion injection is $0,0968 \text{ h}^{-1}$, and when the drug paste is applied, $0,0581 \text{ h}^{-1}$. As a result, the half-life of phenol in the first case is 7.2 hours, and in the second case – 11.9 hours. The relative bioavailability of the phenol from the paste containing 5% of the ASD-3 is 14.38% to the 5% emulsion injected into the rats body intraperitoneally.

Conclusion. Comparison of the phenol concentration in the blood serum of experimental animals in two ways of application showed that the skin application of a drug paste containing 5% of ASD-3 provides a 10 times lower content of phenol in the blood serum compared to the intraperitoneal application of an emulsion with 5% ASD-3. 15 minutes after the skin application, the components of the drug start to be detected in the blood serum, reaching its maximum concentration in 1.5–2 hours, subsequently gradually decreasing.

Keywords: ASD 3 fraction, phenol, multicomponent substance, experimental pharmacokinetics, high performance liquid chromatography.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Vladimir I. Nozdrin and Konstantin S. Guzev planned the experiment, Gennadii A. Piavchenko carried out blood samples for research. Margarita E. Ivanova performed a study of blood plasma by high performance liquid chromatography. Authors Konstantin S. Guzev and Gennadii A. Piavchenko participated in a data processing. Authors Konstantin S. Guzev and Margarita E. Ivanova provided the theoretical calculations. Authors Gennadii A. Piavchenko, Vladimir I. Nozdrin and Sergey L. Kuznetsov participated in the interpretation of the data and wrote the text of the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Nozdrin V. I., Piavchenko G. A., Ivanova M. E., Guzev K. S., Kuznetsov S. L. Evaluation of pharmacokinetical parameters of phenol, a component of Dorogov's antiseptic-stimulator 3 fraction paste. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 57–61.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение фармакокинетики (ФК) на доклиническом этапе исследования лекарственных средств является обязательным. По данным литературы [5], препараты на основе АСД-3 применяются при лечении аллергодерматозов. Основное действующее вещество представляет собой многокомпонентную субстанцию, получаемую путём термической переработки мясокостной массы крупного рогатого скота, которая содержит в своём составе более 120 веществ, в том числе биологически активных [1, 7]. В числе компонентов, содержащихся в достаточной для количественного анализа мере в составе АСД-3, наибольшие концентрации отмечены для пиррола (20,2 мг/г), фенола (17,9 мг/г), крезоло и его производных (14,3 мг/г) и индола (3,6 мг/г) [2]. Одним из предпочтительных веществ для исследования ФК является фенол, поскольку он является субстанцией и применяется в фармацевтической технологии при изготовлении лекарственных средств. Препарат стандартизован по показателям: описание, подлинность, масса содержимого упаковки, pH водного извлечения, однородность, микробиологическая чистота. Также в проект фармакопейной статьи предприятия будет включен метод количественного определения фенола, изложенный в настоящей публикации.

АСД-3 был получен более полувека назад, однако до настоящего времени сведения о его эффекте на структуру и функции органов и их систем остаются в рамках данных 70-х годов прошлого столетия [3], данные о фармакокинетике компонентов препарата отсутствуют.

Все вышеперечисленное говорит об актуальности исследования, целью которого явилось изучение некоторых параметров фармакокинетики компонентов препарата, содержащего 5% АСД-3 в дозе 0,5 г/кг при внутрибрюшинном и накожном способе применения на примере фенола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 84 крысах-самках массой 100–120 г., полученных из питомника «Андреевка», филиала ФГБУН «НЦБМТ ФМБА» России. После прохождения двухнедельного карантина, крыс рандомизировали в две группы по 42 особи (7 подгрупп по 6 животных в каждой временной точке). В первую группу входили животные, которым внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл/кг вводили 5% водную эмульсию субстанции АСД-3, а во вторую группу – животные, которым на выстриженные участки кожи межлопаточной области спины площадью 4×4 см² наносили цинковую пасту, содержащую 5% АСД-3 в количестве 0,5 г/кг. После введения эмульсии или аппликации пасты животных выводили из эксперимента через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 6 и 8 часов с дальнейшим забором крови из брюшной аорты в центрифужные пробирки. Кровь отстаивали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Полученную сыворотку замораживали и хранили в морозильной камере при –20 °С до проведения анализа.

Для количественного определения фенола использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Япония) с использованием диодно-матричного детектора, хроматографической колонки Phenomenex с сорбентом Luna C18 (4,6×150 мм, 5 мкм). Детектирование проводили при длине волны, равной 270 нм. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил: 0,4% раствор уксусной кислоты в объемном соотношении 30:70 (V/V). Элюирование проводили в изократическом режиме при постоянной скорости потока 1 мл/мин. Раствор стандартного образца фенола с концентрацией 250 мкг/мл готовили в изопропанол. Раствор хранили при температуре 2–8 °С. Рабочие растворы фенола с концентрациями в диапазоне от 0,02 до

125 мкг/мл готовили путем разведения исходного раствора. В вials для ВЭЖХ из светозащитного стекла с помощью шприца помещали 1 мл обработанной сыворотки крови, добавляли 1 мл соответствующего стандартного раствора фенола, встряхивали на шейкере в течение 10 секунд, центрифугировали в течение 5 минут при 6000 об/мин, отбирали шприцем 500 мкл надосадочного слоя жидкости, помещали в автосамплер для инъектирования. Калибровочные растворы фенола в сыворотке крови готовили в диапазоне концентраций 0,02–12,5 мкг/мл. Хроматографировали испытуемые растворы исследуемых образцов, калибровочные растворы фенола в сыворотке крови и рабочие растворы стандартного образца фенола.

Концентрацию фенола в крови исследуемых образцов определяли по калибровочной кривой, построенной по площадям пиков его образцов, и показывающим зависимость площади пика фенола от его концентрации в сыворотке крови. Методика является оригинальной разработкой АО «Ретиноиды» [4].

Таблица 1. Концентрация фенола (мкг/мл) в сыворотке крови животных после однократного внутрибрюшинного введения 5% эмульсии препарата АСД-3 (0,5 г/кг)

Table 1. Phenol concentration (µg/ml) in a blood serum of animals after single intraperitoneal administration of 5% ASD-3 drug emulsion (0,5 g/kg)

Номер животного	Время взятия крови, ч						
	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8
1	0,051	0,071	0,113	0,156	0,117	0,076	0,047
2	0,048	0,069	0,098	0,102	0,103	0,089	0,053
3	0,048	0,087	0,099	0,123	0,152	0,058	0,045
4	0,05	0,055	0,111	0,173	0,076	0,069	0,072
5	0,057	0,053	0,158	0,135	0,068	0,076	0,051
6	0,056	0,051	0,095	0,148	0,079	0,062	0,048
M±SE	0,052±0,002	0,064±0,006	0,112±0,010	0,140±0,010	0,099±0,013	0,072±0,005	0,053±0,004

Валидацию методики проводили на основании руководства по валидации биоаналитических методик FDA [11] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, точность (прецизионность), оценка переноса, коэффициент извлечения, определение нижнего предела количественного определения фенола, стабильность растворов.

Для подготовки и анализа проб использовали следующие реактивы: стандартный образец фенол (USP), ацетонитрил квалификации «для ВЭЖХ» (Merck, Германия), уксусная кислота «для ВЭЖХ» (Merck, Германия). Пробоподготовка образцов заключалась в осаждении белков метанолом и последующем центрифугировании.

Для подтверждения специфичности хроматографировали растворы образцов «холостой» сыворотки крови (бланк матрицы). На хроматограммах сыворотки крови (бланк матрицы) нет интерферирующих пиков со временем удерживания фенола (около 6 мин). НПКО составлял 0,002 мкг/мл.

Оценку динамики всасывания в кровь и выделения из неё фенола, содержащегося в АСД-3, проводили с помощью программного обеспечения ASKID на основе построенной однокамерной модели со всасыванием. Рассчитывали основные фармакокинетические параметры поступления фенола в кровь: максимальную концентрацию, время её достижения, площадь под фармакокинетической кривой, время полувыведения, константы площади элиминации и абсорбции, общий клиренс, объём распределения [6]. Для каждой временной точки вычисляли средние значения концентрации и стандартную ошибку (M±SE). На основании полученных результатов определяли относительную биодоступность фенола из пасты, содержащей 5% АСД 3 фракции.

Таблица 2. Концентрация фенола (мкг/мл) в сыворотке крови животных после однократной аппликации на кожу спины пасты, содержащей 5% АСД-3 (0,5 мг/кг)

Table 2. Phenol concentration (µg/ml) in a blood serum of animals after single skin application of 5% ASD-3 drug paste (0,5 g/kg)

Номер животного	Время взятия крови, ч						
	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8
1	0,008	0,005	0,008	0,008	0,011	0,008	0,004
2	0,005	0,009	0,010	0,009	0,010	0,006	0,006
3	0,009	0,008	0,008	0,007	0,019	0,007	0,003
4	0,006	0,009	0,008	0,010	0,010	0,009	0,004
5	0,007	0,010	0,012	0,015	0,009	0,008	0,004
6	0,006	0,009	0,008	0,015	0,010	0,007	0,006
M±SE	0,007±0,001	0,008±0,001	0,009±0,001	0,011±0,001	0,012±0,002	0,008±0,001	0,005±0,001

Исследование выполняли в соответствии с межгосударственным стандартом «Принципы надлежащей лабораторной практики» [8] согласно утверждённому плану и стандартным операционным процедурам центра доклинических исследований с учётом руководств по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9, 10]. Манипуляции с животными, а также условия их содержания утверждены этической комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. Крысы находились в помещениях при 20–26 °С и относительной влажности 30–70%. Температуру и влажность контролировали с помощью компьютер-совместимых термометров и психрометров ежедневно в течение

ние всего дня. В комнатах поддерживали 12-часовой цикл освещения и 10-кратную смену объёма воздуха в час.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью валидированной методики проанализировали 42 образца, полученные после внутрибрюшинного введения 5% эмульсии препарата АСД-3 и 42 образца – после кожного применения пасты, содержащей 5% АСД-3. Как видно из рисунка 1, фенол, как компонент 5% эмульсии АСД-3 при внутрибрюшинном введении обнаруживается в крови крыс через 15 минут (0,052 мкг/мл). Его средняя концентрация быстро растёт, достигая к 1,5 часам 0,14 мкг/мл. В дальнейшем содержание фенола медленно снижается и достигает исходного уровня к 8 часам.

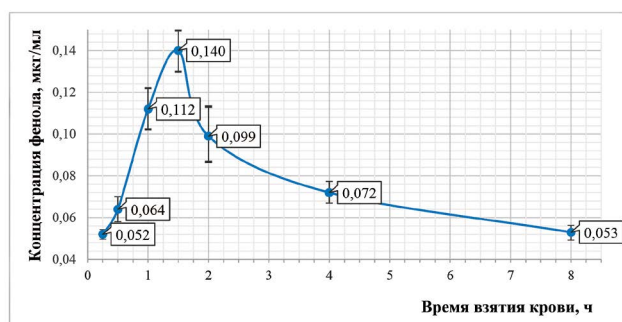


Рисунок 1. Динамика концентрации фенола в сыворотке крови крыс (мкг/мл) после внутрибрюшинного введения 5% эмульсии субстанции АСД-3 в дозе 0,5 г/кг

Figure 1. Dynamics of phenol concentration in the serum of rats (µg/ml) after intraperitoneal administration of 5% ASD-3 drug emulsion (0,5 g/kg)

При кожной аппликации пасты, содержащей 5% АСД-3, фенол в крови животных обнаруживается также через 15 минут (рисунок 2). Его средняя концентрация составляет 0,007 мкг/мл. Максимальный уровень

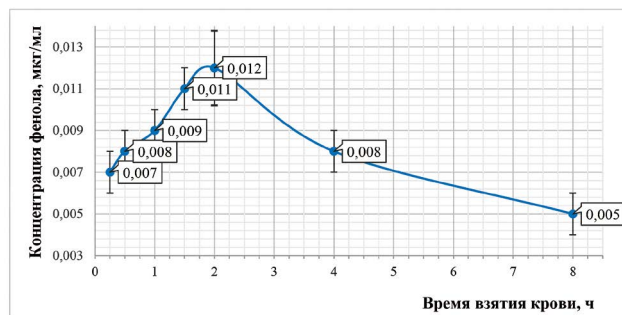


Рисунок 2. Динамика концентрации фенола в сыворотке крови крыс (мкг/мл) после кожной аппликации пасты, содержащей 5% АСД-3 в дозе 0,5 г/кг

Figure 2. Dynamics of phenol concentration in the serum of rats (µg/ml) after skin application of 5% ASD-3 drug paste (0,5 g/kg)

фенола отмечен через 2 часа после начала эксперимента (0,012 мкг/мл), и к 8 часам снижался до исходного уровня.

Сравнение концентрации фенола в крови экспериментальных животных после двух путей введения показало, что кожное нанесение препарата, содержащего 5% АСД-3, обеспечивает в 10 раз меньшее содержание фенола в крови в сравнении с внутрибрюшинным введением эмульсии с 5% АСД-3.

Показатели, характеризующие процесс выведения фенола из крови крыс при внутрибрюшинном введении, превосходят таковые при аппликации препарата на кожу. Константа скорости элиминации при внутрибрюшинном введении равняется $0,0968 \text{ ч}^{-1}$, а при кожном нанесении препарата – $0,0581 \text{ ч}^{-1}$. В результате этого период полувыведения фенола в первом случае равняется 7,2 ч, а во втором случае – 11,9 ч. Факт более быстрого выведения фенола из организма крыс при внутрибрюшинном введении подтверждают результаты расчёта общего клиренса и общего объёма распределения фенола. Расчёты площади под кривой «концентрация–время» показали, что при внутрибрюшинном введении эмульсии она равна $1,14 \text{ мкг} \times \text{ч/мл}$, а при аппликации препарата на кожу – лишь $0,16 \text{ мкг} \times \text{ч/мл}$. Относительная биодоступность фенола из пасты, содержащей 5% АСД 3 фракции составляет 14,38% от 5% эмульсии, введённой в организм крыс внутрибрюшинно (таблица 3).

Таблица 3. Основные фармакокинетические параметры фенола после однократного внутрибрюшинного введения и кожного нанесения препарата

Table 3. Basic pharmacokinetic parameters of phenol after single intraperitoneal administration and skin application of 5% ASD-3 drug

Параметры (обозначения, единицы измерения)	При внутрибрюшинном введении	При кожном нанесении
Константа скорости элиминации (K_{el} , $1/\text{ч}$)	0,0968	0,0581
Константа скорости абсорбции (K_{abs} , $1/\text{ч}$)	2,54	5,27
Время полувыведения ($T_{1/2}$, ч)	7,2	11,9
Общий клиренс (Cl, мл/мин/кг)	7284	50803
Объём распределения (V, л/кг)	4514	52495
Площадь под кривой (AUC, мкг $\times$ ч/мл)	1,14	0,16

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенол как компонент пасты, содержащей 5% АСД-3, выявляется в сыворотке крови через 15 минут после кожного применения препарата. Максимальной концентрации в сыворотке крови фенол достигает

ет через 1,5–2 часа и в дальнейшем снижается. Период его полувыведения составляет 11,9 ч, относительная биодоступность – 14,38%.

ЛИТЕРАТУРА

- Багирова В. Л., Нечаева Е. Б., Осипов А. С., Гузев К. С. Применение ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием для анализа лекарственного препарата АСД Ф-3. «Фитофарм 2005»: материалы IX международного съезда. 2005; 517–519.
- Багирова В. Л., Нечаева Е. Б., Осипов А. С., Гузев К. С., Ноздрин К. В. Применение ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием для идентификации фенолов препарата АСД-3. Сборник «Актуальные проблемы создания новых препаратов природного происхождения». 2006; 26–28.
- Дерябина З. И., Николаев А. В. Химико-фармакологическая характеристика препарата АСД. Труды Всесоюзного института экспериментальной ветеринарии. 1968; 35: 326–339.
- Иванова М. Е., Ноздрин В. И., Гузев К. С., Пронина К. С., Пьявченко Г. А., Кузнецов С. Л. Разработка и валидация методики количественного определения фенола, входящего в состав пасты с антисептиком-стимулятором Дорогова 3 фракции, методом ВЭЖХ. Альманах «Ретиноиды». 2019; 17–22.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства. 12-е изд. М.: Медицина, 1993; 491.
- Мирошниченко И. И. Основы фармакокинетики. М.: МДМПринт, 2017; 7–18.
- Осипов А. С., Амаспюр Д. А., Нечаева Е. Б., Грецкая Т. Н. Применение ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием для анализа низкокипящих фракций АСД. Тезисы докладов XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». 2005; 783.
- Принципы надлежащей лабораторной практики: ГОСТ 33044–2014. Введён 01.08.15. М.: Стандартинформ. 2015; 12.
- Миронов А. Н. (ред.). Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012; 944.
- Фисенко В. П. (ред.). Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум. 2000; 398.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Government Printing Office: Washington, DC. 2001.

REFERENCES

- Bagirova V. L., Nechaeva E. B., Osipov A. S., Guzev K. S. The use of HPLC with diode-matrix detection for the ASD F-3 drug analysis. «Fitofarm 2005»: materials of IX international meeting. 2005; 517–519 (in Russ.).
- Bagirova V. L., Nechaeva E. B., Osipov A. S., Guzev K. S., Nozdryn K. V. Application of HPLC with diode-matrix detection to identify phenols of the ASD-3 drug. Proceeding book «Actual problems of creating new products of natural origin». 2006; 26–28 (in Russ.).
- Deryabina Z. I., Nikolaev A. V. Chemical and pharmacological characteristics of the ASD drug. Proceedings of the All-Union Institute of Experimental Veterinary Medicine. 1968; 35: 326–339 (in Russ.).
- Ivanova M. E., Nozdryn V. I., Guzev K. S., Pronina K. S., P'yavchenko G. A., Kuznetsov S. L. Development and validation of methods for the quantitative determination of phenol, which is part of the paste with an antiseptic Dorogov's stimulator 3 fraction by the HPLC method. Almanakh «Retinoidy». 2019; 17–22 (in Russ.).
- Mashkovskiy M. D. Medicines. 12 ed. M.: Meditsina. 1993; 491 (in Russ.).
- Miroshnichenko I. I. Basics of pharmacokinetics. M.: MDMPrint. 2017; 7–18 (in Russ.).
- Osipov A. S., Amaspyur D. A., Nechaeva E. B., Gretskeya T. N. The use of HPLC with diode-matrix detection for the analysis of low-boiling

fractions of the ASD. Abstracts of the reports of the XII Russian National Congress «Human and Medicine». 2005; 783 (in Russ.).

- Principles of good laboratory practice: GOST 33044–2014. Introduced 01.08.15. M.: Standardinform. 2015; 12 (in Russ.).
- Mironov A. N. (ed.). Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. M.: Grif and K. 2012; 944 (in Russ.).
- Fisenko V. P. (ed.). Guidelines on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M.: Remedium. 2000; 398 (in Russ.).
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Government Printing Office: Washington, DC. 2001.

Оригинальная статья/Research article

Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ в пленках для лечения кариеса дентина

Е. С. Березина^{1*}, А. Л. Голованенко¹, И. В. Алексеева¹

1 – ФГБУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

*Контактное лицо: Березина Елена Станиславовна. E-mail: berezina.e.s@yandex.ru

Статья получена: 16.05.2019. Статья принята к печати: 16.08.2019

Резюме

Введение. Несмотря на наличие широкого выбора лекарственных препаратов (ЛП), при лечении кариеса с использованием традиционных методов эффективность его лечения составляет 62,5–75,4%. В результате комплекса научно-экспериментальных исследований, проведенных на кафедре фармацевтической технологии ПГФА совместно с кафедрой стоматологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ПГМУ им. Е. А. Вагнера, предложен медикаментозный способ лечения среднего и глубокого кариеса реминерализующим гелем и пленками. В ходе подготовки нормативной документации на пленки для лечения кариеса дентина проведена валидация методик, предназначенных для контроля качества действующих веществ.

Цель. Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ в пленках для лечения кариеса дентина.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели использовали активные фармацевтические субстанции фармакопейного качества. При разработке методик испытания на подлинность за основу взяты методики с характерными реакциями на катионы и анионы. Для количественного определения кальция хлорида использован обратный комплексометрический метод, для калия фосфата двузамещенного и натрия фторида фотоэлектроколориметрический метод, для хлоргексидина биглюконата спектрофотометрический метод. Объектами исследования являлись пять серийных образцов пленок.

Результаты и обсуждение. На основании проведенного исследования выбраны методики испытания на подлинность, которые характеризуются отрицательным аналитическим сигналом на модельных смесях, свободных от определяемого компонента, и плацебо, и положительным аналитическим сигналом на модельных смесях различного состава, содержащих определяемый компонент. Изучены валидационные характеристики методик количественного определения действующих веществ в пленках для лечения кариеса дентина, которые могут быть использованы для включения в нормативную документацию на разработанные пленки.

Заключение. По результатам валидации установлено, что методики являются специфичными как для испытания на подлинность, так и количественного определения действующих веществ в пленках, характеризуются точностью и повторяемостью, линейной зависимостью в аналитической области $\pm 30\%$ по отношению к заявленному содержанию действующих веществ в пленках, что позволяет использовать их для достоверной оценки качества.

Ключевые слова: валидация, кариес дентина, пленки, подлинность, количественное определение, специфичность, линейность, правильность, повторяемость.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. Л. Голованенко, И. В. Алексеева – разработали состав пленок для лечения кариеса дентина, изготовили модельные смеси и серийные образцы. Е. С. Березина предложила методики определения действующих веществ в пленках и провела исследования валидационных характеристик, предложенных методик. Все авторы участвовали в обработке экспериментальных данных, обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Березина Е. С., Голованенко А. Л., Алексеева И. В. Валидация методик испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ в пленках для лечения кариеса дентина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 62–68.

Validation of Methods of Identification and Quantitative Determination of Active Ingredients in Films for Treatment of Caries of Dentin

Elena S. Berezina^{1*}, Anna L. Golovanenko¹, Irina V. Alekseeva¹

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Poleyvaya str., Perm, 614990, Russia

*Corresponding author: Elena S. Berezina. E-mail: berezina.e.s@yandex.ru

Received: 16.05.2019. Accepted: 16.08.2019

Abstract

Introduction. Even though a wide range of the products for caries treatment is available, the efficiency of its treatment with the traditional methods is 62,5–75,4%. As a result of the set of researches carried out at the Department of Pharmaceutical Technology of the Perm State Pharmaceutical Academy, in cooperation with the Department of Dentistry of the Advanced Training and Professional Retraining Faculty of E. A. Wagner Perm State Medical University, a medical method of moderate and advanced caries treatment with remineralizing gel and films is proposed. During the preparation of the product specification file for the dentin caries treatment film, validation of the methods of the active ingredients quality control has been undertaken.

Aim. Validation of the methods of identity tests and of potency assays of dentin caries treatment films.

Materials and methods. In order to achieve the aim, active pharmaceutical substances of pharmacopoeial quality have been used. As a base for developing the methods of identity tests the methods with distinctive reactions to cations and anions have been taken. For the potency assay of calcium chloride a complexometric back-titration has been used; photoelectric colorimetry for potassium phosphate dibasic and sodium fluoride; spectrophotometry for chlorhexidine bigluconate. Five production samples of the films were the object of the research.

Results and discussion. Basing on the research results, the choice was made in favour of the methods of identity tests that are characterized by negative analytical response when applied to the model mixtures which are free from analyte and placebo, and by positive analytical response when applied to the model mixtures of various composition containing analyte. The validation characteristics of the methods of dentin caries treatment films potency assays, which may be included in the product specification file, have been studied.

Conclusion. Validation results show that the chosen methods are specific for both identity tests and potency assays of active substances in the dentin caries treatment films; they are characterized by precision, repeatability and linear dependency in the analytical range of $\pm 30\%$ in regard to the specified active substance concentration in the films. All that allows using them for a reliable quality assessment.

Keywords: validation, caries dentin, film, authenticity, quantification, specificity, linearity, accuracy, repeatability.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anna L. Golovanenko, Irina V. Alekseeva – developed the composition of films for the treatment of dentin caries, produced model mixtures and serial samples. Elena S. Berezina suggested methods of determination of active ingredients in the films and has conducted studies of the validation characteristics, the proposed techniques. All authors participated in the processing of experimental data, discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Berezina E. S., Golovanenko A. L., Alekseeva I. V. Validation of methods of identification and quantitative determination of active ingredients in films for treatment of caries of dentin. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 62–68.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на наличие широкого выбора лекарственных препаратов (ЛП) при лечении кариеса с использованием традиционных методов, эффективность его лечения составляет 62,5–75,4%. В процессе лечения часто проявляются различные осложнения. К принципиально новым технологиям относятся аппликационные лекарственные формы (ЛФ) на основе полимеров, содержащие основные минерализующие компоненты: кальций, фосфат и фторид ионы. Это дает возможность объединить эффект в одной аппликации и позволяет индивидуализировать лечение и реминерализацию дентина на первом этапе лечения среднего и глубокого кариеса. ЛП реминерализующего действия на основе полимеров просты, удобны, безопасны и доступны для применения, что позволяет охватить большую часть населения и снизить общий уровень распространенности кариеса [1–3].

В результате комплекса научно – экспериментальных исследований, проведенных на кафедре фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии совместно с кафедрой стоматологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Пермского государственного медицинского университета им. Е. А. Вагнера, предложен медикаментозный способ лечения среднего и глубокого кариеса реминерализующим гелем и пленками. В пленки для лечения кариеса дентина одновременно введены минерализующие вещества, содержащие ионы кальция, фосфата и фторида. Благодаря структурированным водным пространствам в пленках обеспечивается защитный эффект относительно их взаимодействия. Это позволяет сохранить минерализующие ионы в свободном активном состоянии и тем самым обеспечить существенное повышение их проникновения в дентин. Моделирование состава пленок осуществлено по кальциевофосфорному коэффициенту 2:1 с учетом основных требований к ЛП для лечения кариеса дентина. Для повышения эффективности лечения кариеса дентина путем воздействия на микроорганизмы в ден-

тинных каналах в состав пленок введен антисептик – хлоргексидина биглюконат (ХГБ) [2–5].

В ходе подготовки нормативной документации на пленки для лечения кариеса дентина разработаны и апробированы методики испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ (ДВ): кальция хлорида, калия фосфата двузамещенного, натрия фторида и ХГБ химическими и инструментальными методами, модифицированными с учетом специфики ЛФ [6–9].

Валидация методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств (ЛС), проводилась в соответствии с ГФ XIV изд. ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [10].

Целью настоящего исследования являлась валидация методик испытания на подлинность и количественного определения ДВ в пленках для лечения кариеса дентина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все активные фармацевтические субстанции (АФС): кальция хлорид (ФС 42-2567-94, АГРОХИМ ОАО «Химзавод им. Л.Я. Карпова», г. Менделеевск, Татарстан, 200916, срок хранения 3 года), калия фосфат двузамещенный (ФС 42-4297-79, ЗАО «ЛенРЕАКТИВ», Россия, 101016, срок хранения 3 года), натрия фторид (ГОСТ 4463-76, «РЕАХИМ», Россия, 201117, срок хранения 3 года, раствор хлоргексидина биглюконата 20% (ФС 42-2761-98, ООО «Армосинтез», г. Калуга, Россия, 300917, срок хранения 3 года) – фармакопейного качества; гелеобразователь – натрий карбоксиметилцеллюлоза (ТУ 2231-034-07507908-01, ЗАО «ВЕКТОН», СПб, Россия, 151216, срок хранения 3 года); пластификатор – глицерин (ФС 42-2202-99, ЗАО «КУПАВНАРЕАКТИВ», Россия, 082016, срок хранения 3 года); вода очищенная (ФС 2.2.0020.15).

Объектами исследования являлись пять серийных образцов пленок.

Для проведения испытаний на подлинность и количественного определения ДВ в пленках были использованы следующие реактивы: азотная кислота

разведенная 16% (азотная кислота разбавленная, х.ч., АО «Вектон», Россия), аммиачный буферный раствор (аммиак водный, ч.д.а., Сигма Тек, Россия; аммоний хлористый, х.ч., АО «Купавнареактив», Россия), аммония молибдата раствор 1% (аммоний молибденовокислый, 4-водный, х.ч., АО «Вектон», Россия), ализаринового красного С раствор 0,075% (ализариновый красный С(S), ч.д.а., АО «Вектон», Россия), железа (III) хлорида раствор 10% (железа хлорид (III), 6-водное, ч., АО «Вектон», Россия), калия пироантимоната раствор (калий сурьмянокислый, 4-водный, ч.д.а., ООО «Химсервис», Россия), кислый раствор хлористого циркония 0,035% (цирконий хлорокись (IV), 8-водный, х.ч., АО «Вектон», Россия), натрия кобальтинитрита раствор 10% (натрий гексанитрокобальтат (III), 0,5-водный, х.ч., АО «Вектон», Россия), натрия эдетата раствор 0,05 М (стандарт-титр: соль динатриевая этилендиамин N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б) 0,1 моль/дм³ (0,1 н), ООО «Уральский завод химической продукции», Россия), олова хлорида раствор 1% (олова хлорид (IV), безводный, ч., АО «Вектон», Россия), серебра нитрата раствор 2% (серебро азотнокислое, х.ч., АльфаХим, Россия), серная кислота концентрированная, серной кислоты раствор 50%, серная кислота разведенная 9,8% (серная кислота, х.ч., Сигма Тек, Россия), танина раствор 0,1% (танин, ч., «ВитаХим», Россия), уксусная кислота разведенная 30% (уксусная кислота, х.ч., АО «Вектон», Россия), хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М (кислота соляная, х.ч., Нева Реактив, Россия).

При разработке методик испытания на подлинность были апробированы как фармакопейные так и не фармакопейные реакции на катионы и анионы, входящие в состав ДВ, а так же реакции на ХГБ.

Количественное определение кальция хлорида проводили методом комплексонометрии, с использованием в качестве титранта раствора натрия эдетата. Для создания необходимого значения pH использовали аммиачный буферный раствор. Так как при апробации прямого способа титрования, после добавления к анализируемому раствору аммиачного буферного раствора выпадет обильный осадок кальция фосфата, был предложен способ обратного титрования. Точную навеску пленок растворяли в воде очищенной, к полученному раствору прибавляли точный объем раствора натрия эдетата и затем аммиачный буферный раствор, такой порядок прибавления реагентов исключает образование осадков кальция фосфата и кальция фторида, так как ионы кальция связываются в комплекс с натрия эдетатом, который становится более прочным после прибавления аммиачного буферного раствора за счет создания оптимального значения pH среды.

Для количественного определения калия фосфата двузамещенного в пленках был предложен метод фотоэлектроколориметрии. Для получения окрашенного раствора использовали реакцию с молибдатом аммония в присутствии хлорида олова (II) как восста-

новителя, в среде серной кислоты 50%, данные условия исключают образование нерастворимых солей кальция фосфата и кальция фторида. Точную навеску пленок помещали в мерную колбу и растворяли в небольшом объеме воды очищенной, к полученному раствору прибавляли точные объемы серной кислоты раствора 50%, растворы аммония молибдата и олова хлорида, тщательно перемешивали и доводили объем водой очищенной до метки. Параллельно проводили реакцию с раствором рабочего стандартного образца калия фосфата двузамещенного в аналогичных условиях.

Для количественного определения натрия фторида использовали метод фотоэлектроколориметрии с применением реакции разрушения цирконил-ализаринового комплекса фторид ионами. Для связывания ионов кальция добавляли раствор натрия эдетат и аммиачный буферный раствор. Точную навеску пленок помещали в мерную колбу, растворяли в небольшом объеме воды очищенной, прибавляли точный объем раствора натрия эдетата и аммиачный буферный раствор, перемешивали, доводили объем водой очищенной до метки. Точный объем полученного раствора переносили в мерную колбу, прибавляли точный объем раствора ализаринового красного С и раствора хлористого циркония, тщательно перемешивали, доводили объем водой очищенной до метки. Раствор выдерживали в течение 30 минут. Параллельно проводили реакцию с раствором рабочего стандартного образца натрия фторида в аналогичных условиях.

Для количественного определения хлоргексидина биглюконата в пленках использовали спектрофотометрический метод в ультрафиолетовой области. Определение проводили в присутствии хлористоводородной кислоты, которая препятствует образованию кальция фосфата и кальция фторида. Точную навеску пленок помещали в мерную колбу, прибавляли точный объем хлористоводородной кислоты и тщательно перемешивали до полного растворения навески, доводили объем водой очищенной до метки. В качестве раствора сравнения использовали раствор пленок без хлоргексидина биглюконата, приготовленный по той же методике. Расчет проводили по удельному показателю поглощения.

Определение фотоэлектроколориметрическим методом проводилось на фотометре КФК-3 («ЗОМЗ», Россия), спектрофотометрическим методом на УФ-спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu», Shimadzu Europa GmbH, Германия). [6–9, 12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности проведения контрольных испытаний разработанных пленок связаны с сочетанием ДВ, склонных к взаимодействию между собой и с трудностью выделения их из полимерной основы, разделения между собой вследствие одинаковой растворимости в средах, используемых в анализе.

Исследовали валидационные характеристики методик испытания на подлинность путем определения их специфичности на модельных смесях известного состава (полный состав пленок, пленки плацебо и смеси с чередующимися активными компонентами). Подлинность компонентов пленок подтверждали характерными реакциями на катионы и анионы: на катион кальция использовали реакцию с серной кислотой разведенной 9,8%; на хлорид ион реакцию с серебром нитрата раствором 2% в присутствии азотной кислоты разведенной 16%; на катион калия применяли реакцию с натрия кобальтинитрита раствором 10% в среде уксусной кислоты разведенной 30%; на фосфат ион использовали реакцию с аммония молибдата раствором 1% в серной кислоте концентрированной и олова хлорида раствором 1% в среде серной кислоты раствора 50%; на катион натрия использовали микрокристаллоскопическую реакцию с раствором калия пироксидом и на фторид ион реакцию с цирконил-ализариновым комплексом; на основание хлоргексидина использовали реакцию с танином раствором 0,1%, на остаток глюконовой кислоты реакцию с железом (III) хлорида раствором 10% [6, 8, 10, 11].

На основании проведенных исследований предложены методики испытания на подлинность, которые характеризуются отрицательным аналитическим сигналом на модельных смесях свободных от определяемого компонента и плацебо, и положительным аналитическим сигналом на модельных смесях различного состава, содержащих определяемый компонент.

Количественное определение кальция хлорида проводили обратным комплексометрическим методом. Для количественного определения калия фосфата двузамещенного и натрия фторида использовали фотоэлектроколориметрический метод, расчет проводили по рабочему стандартному образцу. Для количественного определения хлоргексидина биглюконата использовали спектрофотометрический

метод, определение проводили при длине волны 253 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм, относительно раствора сравнения пленок без ХГБ [6–13].

Специфичность исследовали в трех параллелях на модельных смесях с чередующимися ДВ от заявленного состава. Результаты представлены в таблице 1.

Полученные результаты статистически обработаны. Доверительные интервалы составили: для кальция хлорида $0,00272 \pm 0,000089$ г, для калия фосфата двузамещенного $0,00367 \pm 0,000262$ г и для натрия фторида $0,000020 \pm 0,000002$ г, ХГБ $0,000051 \pm 0,00000196$ г. Анализ модельных смесей показал, что влияние ДВ при совместном присутствии в различных составах на результаты определений незначительное, следовательно, методики количественного определения ДВ пленок являются специфичными.

Линейность методик исследовали в трех параллелях на модельных смесях в интервале от 70% до 130% от заявленного содержания ДВ. Результаты представлены графически на рисунках 1–4 в ви-

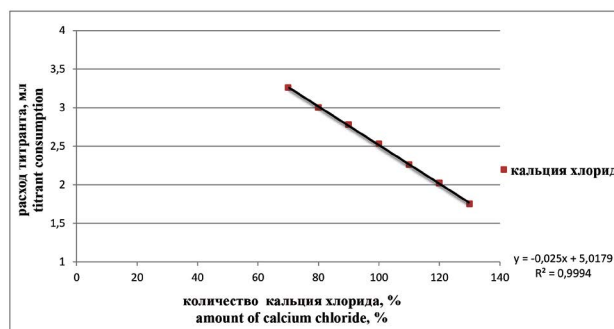


Рисунок 1. Зависимость расхода титранта (мл) от количества кальция хлорида в модельных смесях (в диапазоне от 70 до 130% от заявленного содержания) по результатам титриметрического определения

Figure 1. The dependence of the titrant flow rate (ml) on the amount of calcium chloride in the model mixtures (in the range from 70 to 130% of the declared content) according to the results of titrimetric determination

Таблица 1. Результаты исследования специфичности методик количественного определения ДВ пленок (содержание ДВ на среднюю терапевтическую дозу (СТД) 0,05 г)

Table 1. Results of the study of specificity of methods of quantitative determination of DV films (the content of DV on the average therapeutic dose (STD) 0.05 g)

Состав модельной смеси	$CaCl_2$		K_2HPO_4		NaF		ХГБ	
	взято, г	найденно, г	взято, г	найденно, г	взято, г	найденно, г	взято, г	найденно, г
$CaCl_2$, K_2HPO_4 , NaF , ХГБ	0,00275	0,00271	0,00370	0,00368	0,000022	0,000019	0,000049	0,000051
$CaCl_2$	0,00275	0,00272	–	–	–	–	–	–
K_2HPO_4	–	–	0,00370	0,00365	–	–	–	–
NaF	–	–	–	–	0,000022	0,000021	–	–
ХГБ	–	–	–	–	–	–	0,000049	0,000050
$CaCl_2$, K_2HPO_4	0,00275	0,00270	0,00370	0,00368	–	–	–	–
$CaCl_2$, NaF	0,00275	0,00273	–	–	0,000022	0,000020	–	–
K_2HPO_4 , NaF , ХГБ	–	–	0,00370	0,00367	0,000022	0,000021	0,000049	0,000051

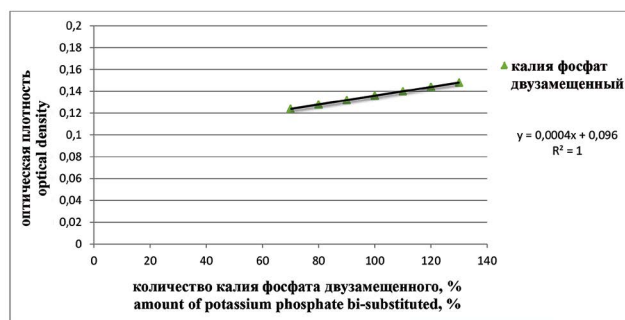


Рисунок 2. Зависимость оптической плотности от количества калия фосфата двузамещенного в модельных смесях при фотоэлектроколориметрическом определении (в диапазоне от 70 до 130% от заявленного содержания)

Figure 2. The dependence of optical density from quantity of potassium phosphate dosagedosage in model mixtures with photoelectrocolorimetry determination (in the range of 70 to 130% of the declared content)

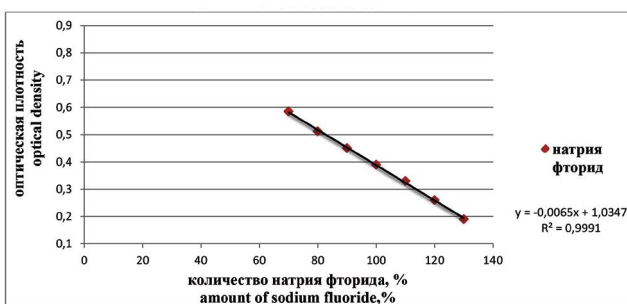


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности от количества натрия фторида в модельных смесях при фотоэлектроколориметрическом определении (в диапазоне от 70 до 130% от заявленного содержания)

Figure 3. The dependence of optical density from quantity of sodium fluoride in model mixtures with photoelectrocolorimetry definition (in the range of 70 to 130% of the declared content)

де зависимости расхода титранта для титриметрических методов анализа и оптической плотности для фотоэлектроколориметрического и спектрофотометрического методов от содержания исследуемого ДВ.

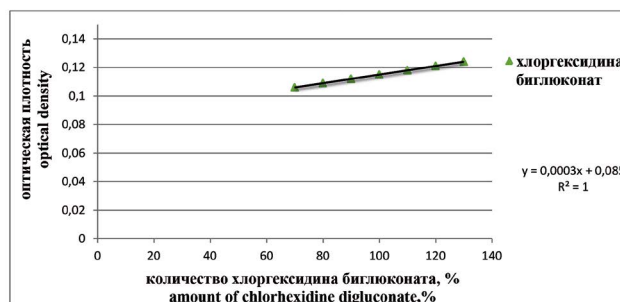


Рисунок 4. Зависимость оптической плотности от количества хлоргексидина биглюконата в модельных смесях при спектрофотометрическом определении (в диапазоне от 70 до 130% от заявленного содержания)

Figure 4. The dependence of optical density on the amount of chlorhexidine bigluconate in model mixtures at spectrophotometric determination (in the range of 70 to 130% of the declared content)

Линейный коэффициент корреляции R составил: для кальция хлорида – 0,999; калия фосфата двузамещенного в пленках – 1,000; натрия фторида – 0,999; хлоргексидина биглюконата – 1,000.

На основании полученных результатов можно утверждать, что соблюдается линейная зависимость между величинами аналитических сигналов и содержанием исследуемых ДВ в пленках в интервале 70–130% от декларируемого количества.

Правильность методик устанавливали по результатам анализа модельных смесей в трех параллелях определения для 7 аналитических концентраций в интервале от 70 до 130% от декларируемого состава. Результаты определения правильности методик представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что отношение «найдено: введено» (Z_i) находится в интервале 97–103%, что свидетельствует об удовлетворительной правильности методик.

Аналитическая область применения предложенных методик установлена в процессе изучения их линейности и правильности, и находится в интервале от 70 до 130% от номинального количества ДВ в пленках.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методик количественного определения ДВ в пленках

Table 2. Results of assessment of correctness of methods of quantitative determination of DV in films

Количество ЛС от заявленного, %	Состав модельной смеси, г				Найдено, г				Z_i , %			
	CaCl ₂	K ₂ HPO ₄	NaF	ХГБ	CaCl ₂	K ₂ HPO ₄	NaF	ХГБ	CaCl ₂	K ₂ HPO ₄	NaF	ХГБ
70	0,00193	0,00259	0,0000154	0,000035	0,00191	0,00256	0,0000150	0,000034	98,96	98,84	97,40	97,14
80	0,00220	0,00296	0,0000176	0,000040	0,00221	0,00300	0,0000172	0,000039	100,45	101,35	97,73	97,50
90	0,00248	0,00333	0,0000198	0,000045	0,00243	0,00330	0,0000196	0,000046	97,98	99,10	98,99	102,22
100	0,00275	0,00370	0,0000220	0,000050	0,00270	0,00381	0,000021	0,000049	98,18	102,97	95,45	98,00
110	0,00303	0,00407	0,0000242	0,000055	0,00300	0,00405	0,0000245	0,000054	99,01	99,51	101,24	98,18
120	0,00330	0,00444	0,0000264	0,000060	0,00326	0,00440	0,0000260	0,000061	98,79	99,10	98,48	101,67
130	0,00358	0,00481	0,0000286	0,000065	0,00356	0,00479	0,0000283	0,000064	99,44	99,58	98,95	98,46

Таблица 3. Результаты количественного определения ДВ пленок (содержание ДВ на СТД 0,05 г)

Table 3. Results of quantitative determination of DV films (the contents on the STD DV 0.05 g)

ДВ	Серия	Метрологические характеристики					
		X , г	$\bar{X}$, г	S , г	$\Delta\bar{X}$	ϵ , %	$\bar{\epsilon}$, %
Кальция хлорид	1	0,00285	0,00274	$0,825 \times 10^{-4}$	$1,026 \times 10^{-4}$	8,05	3,74
	2	0,00271				8,46	
	3	0,00265				8,65	
	4	0,00280				8,19	
	5	0,00269				8,53	
Калия фосфат двузамещенный	1	0,00368	0,00370	$1,046 \times 10^{-4}$	$1,300 \times 10^{-4}$	7,90	3,51
	2	0,00379				7,67	
	3	0,00356				8,17	
	4	0,00381				7,63	
	5	0,00364				7,99	
Натрия фторид	1	0,000022	0,000021	$1,58 \times 10^{-6}$	$1,96 \times 10^{-6}$	24,77	9,33
	2	0,000021				25,95	
	3	0,000023				23,70	
	4	0,000019				28,68	
	5	0,000020				27,25	
ХГБ	1	0,000049	0,000049	$1,58 \times 10^{-6}$	$1,96 \times 10^{-6}$	8,96	4,00
	2	0,000050				8,78	
	3	0,000048				9,15	
	4	0,000047				9,35	
	5	0,000051				8,61	

Прецизионность (повторяемость) методик оценивали по результатам анализа пяти серийных образцов. Экспериментальные данные статистически обработаны. Результаты количественного определения ДВ в пленках представлены в таблице 3.

Доверительные интервалы ($X \pm \Delta X$) составили: для кальция хлорида $0,00274 \pm 0,00010$ г, для калия фосфата двузамещенного $0,00370 \pm 0,00013$ г, для натрия фторида $0,000021 \pm 0,000002$ г, ХГБ $0,000049 \pm 0,000002$ г; стандартное отклонение (S) для кальция хлорида $0,0000825$; для калия фосфата двузамещенного $0,0001046$; для натрия фторида $0,00000158$; для ХГБ $0,00000158$. Можно сделать заключение о прецизионности исследуемых методик под влиянием внутрилабораторных вариаций.

Валидируемые методики использованы в рамках проведения стандартизации пленок для определения показателей «Подлинность» и «Количественное определение».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены валидационные характеристики методик испытания на подлинность и количественного определения кальция хлорида, калия фосфата двузамещенного, натрия фторида и ХГБ в пленках для лечения кариеса дентина. По результатам валидации установлено, что методики являются специфичными для определения содержания ДВ в пленках, характеризуются точностью и прецизионностью (повторяемостью), линейной зависимостью в аналитической области $\pm 30\%$ по отношению к заявленному содержанию ДВ в плен-

ках, что позволяет использовать их для достоверной оценки качества. Полученные данные будут использованы для составления проекта НД на пленки для лечения кариеса дентина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голованенко А. Л. Использование комбинированных лекарственных паст для лечения кариеса дентина. *Стоматология для всех*. 2016; 3: 6–11.
2. Голованенко А. Л., Березина Е. С., Алексеева И. В., Павлова Г. А., Першина Р. Г. Создание рациональной лекарственной формы для лечения кариеса дентина. *Медицинский альманах*. 2016; 1(41): 116–119.
3. Леонова Л. Е., Павлова Г. А., Першина Р. Г., Голованенко А. Л. Эффективность лечения кариеса дентина с использованием лекарственного средства реминерализующего действия. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 2(33): 71–75.
4. Голованенко А. Л., Смирнова М. М., Алексеева И. В., Блинова О. А. Основные подходы к стандартизации пленок лекарственных. *Современные проблемы науки и образования*. 2012; 2. Available at: <http://www.science-education.ru/102-5694> (дата обращения 07.03.2019).
5. Леонова Л. Е., Першина Р. Г., Голованенко А. Л., Павлова Г. А., Березина Е. С. Патент 2560680. Средство для лечения кариеса дентина. Заявл. 17.06.2014; опубл. 20.08.2015; приор. 17.06.2014.
6. Березина Е. С., Голованенко А. Л. Разработка методик качественного и количественного определения фторидов в геле реминерализующего действия. *Современные проблемы науки и образования*. 2012; 6. Available at: <http://www.science-education.ru/106-7410> (дата обращения 13.11.2012).
7. Березина Е. С., Голованенко А. Л., Алексеева И. В. Валидация методики количественного определения хлоргексидина биглюконата в геле для лечения кариеса дентина. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017; 4(58): 133–135.
8. Березина Е. С., Голованенко А. Л., Алексеева И. В. Разработка методик качественного и количественного определения фосфатов в пленках лекарственных реминерализующего действия. *Фармация*. 2015; 1: 7–9.

9. Третьякова Е. В., Березина Е. С., Голованенко А. Л., Алексеева И. В., Першина Р. Г. Валидация методик количественного определения компонентов в пленках лекарственных для лечения кариеса эмали. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 1. Available at: <http://www.science-education.ru/121-19155> (дата обращения 19.05.2015).
10. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. М., 2018; 1: 1814. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/HTML>.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. М., 2018; 3: 5187. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/HTML>.
12. Голованенко А. Л., Кириллова Р. В., Одегова Т. Ф., Павлова Г. А. Стандартизация геля для лечения глубокого кариеса. *Химико-фармацевтический журнал*. 2006; 4: 54–56.
13. Голованенко А. Л., Березина Е. С., Третьякова Е. В., Першина Р. Г., Алексеева И. В. Стандартизация пленок для лечения кариеса эмали. Фундаментальные исследования. 2014; 9(5): 1038–1041.
5. Leonova L. E., Pershina R. G., Golovanenko A. L., Pavlova G. A., Bepezina E. C. Patent 2560680. Dentin caries treatment agent. Claim. 06.17.2014; publ. 08.20.2015; prior 06.17.2014 (in Russ.).
6. Bepezina E. C. Golovanenko A. L. Development of methods for qualitative and quantitative determination of fluoride in a gel of reactive activity. *Current problems of science and education*. 2012; 6. Available at: <http://www.science-education.ru/106-7410> (accessed 13.11.2012) (in Russ.).
7. Bepezina E. C., Golovanenko A. L., Alekseeva I. V. Validation of the method of chlorexgidine digluconate in a gel for the treatment of carine dentine. *International research journal*. 2017; 4(58): 133–135 (in Russ.).
8. Berezina E. S., Golovanenko A. L., Alekseeva I. V. Development of methods for the qualitative and quantitative determination of phosphates in films of medicinal remineralizing action. *Pharmacy*. 2015; 1: 7–9 (in Russ.).
9. Tpet'jakova E. V., Bepezina E. C., Golovanenko A. L., Alekseeva I. V., Pershina R. G. Validation of methods of collective definition of components in medicinal films for caries of enamel. *Current problems of science and education*. 2015; 1. Available at: <http://www.science-education.ru/121-19155>, (accessed 19.05.2015) (in Russ.).
10. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 1: 1814. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/HTML> (in Russ.).
11. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. M., 2018; 3: 5187. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/HTML> (in Russ.).
12. Golovanenko A. L., Kirillova R. V., Odegova T. F., Pavlova G. A. Standardization of the gel for the treatment of deep caries. *Chemical-Pharmaceutical Journal*. 2006; 4: 54–56 (in Russ.).
13. Golovanenko A. L., Bepezina E. C., Tpet'jakova E. V., Pershina R. G., Alekseeva I. V. Standardization of films for the treatment of caries of enamel. *Fundamental Research*. 2014; 9(5): 1038–1041 (in Russ.).

REFERENCES



ДОБРО ПОЖАЛОВАТЬ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГ!

Реклама

IX ЕЖЕГОДНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПАРТНЕРИНГ-ФОРУМ «LIFE SCIENCES INVEST. PARTNERING RUSSIA»

пройдет в Санкт-Петербурге,
7-8 ноября 2019 года.

800+
специалистов
в области Life Sciences

40+
мероприятий в рамках
деловой программы

100+
докладов
и презентаций



регистрация на форум



Министерство
экономического
развития РФ



МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



МИНПРОМТОРГ
РОССИИ

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

Новости GMP

ОТРАСЛЕВОЙ ПАРТНЕР

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОТРАСЛЬ
Pharmaceutical Industry Review

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПАРТНЕР

Фармацевтический
ВЕСТНИК

www.lsipr.ru



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к инсулину (гларгин) в плазме крови человека

Н. Б. Абраменко^{1,2,3*}, П. И. Внукова^{3,4}, Е. С. Головина³, И. Е. Макаренко⁵, А. А. Мосикян⁵,
А. Г. Никифорова³, П. В. Гремякова³, В. И. Казей³

1 – ФГБУН институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, 119991, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47

2 – ФГБУН институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 119071, Россия, Москва, Ленинский просп. д. 33

3 – ООО «Экзакт Лабс», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2

4 – Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии-МВА имени К. И. Скрябина, 109472, Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

5 – ООО «ГЕРОФАРМ», 191119, Россия, Санкт-Петербург, ул. Звенигородская, д. 9

*Контактное лицо: Абраменко Наталья Борисовна. E-mail: n.abramenko@exactelabs.com

Статья получена: 20.05.2019. Статья принята к печати: 02.07.2019

Резюме

Введение. Проведение исследования иммуногенности терапевтических белков, таких как аналоги человеческого инсулина, является одним из актуальных и востребованных направлений в медицине и фармацевтике. Определение возможности выработки нейтрализующих антител к инсулину, уменьшающих терапевтический эффект принимаемого препарата у пациентов, является важным этапом для понимания фармакологического профиля лекарственного препарата. Применение клеточных методов анализа на антитела позволяет проводить определение нейтрализующих антител к инсулину.

Цель. Адаптация и валидация методики оценки иммуногенности инсулина в плазме крови человека.

Материалы и методы. В основе метода лежит использование клеточной линии *iLiteTM Insulin Assay Ready Cells* [1], в геном которой встроен репортёрный ген люциферазы светлячка (Firefly) под контролем инсулинозависимого промотора. При увеличении концентрации инсулина экспрессия люциферазы светлячка (Firefly) увеличивается, что позволяет использовать данную клеточную линию для оценки количества нейтрализующих инсулин антител. Для нормализации по количеству клеток и учёта влияния матричного эффекта исследуемых образцов используется второй репортёрный ген люциферазы Renilla, который экспрессируется под контролем конститутивного промотора. Активность обеих люцифераз измеряли с помощью набора реагентов *DualGlo Luciferase Assay System (Promega)* [2].

Результаты и обсуждения. Были установлены оптимальные концентрация инсулина и степень разбавления плазмы/сыворотки для определения нейтрализующих антител к инсулину. Показана долгосрочная стабильность нейтрализующих антител к инсулину в плазме крови человека более 3-х месяцев. Описанная методика была применена при сравнительном исследовании безопасности и иммуногенности аналогов инсулина (Гларгин).

Заключение. Разработана и валидирована методика определения антител к инсулину в K₂EDTA плазме крови человека с помощью тест-системы на основе клеточной линии *iLiteTM Insulin Assay Ready Cells*; в основе метода лежит оценка связывания альфа цепи инсулина с высокоаффинным гетеродимерным рецептором CD220.

Ключевые слова: нейтрализующие антитела, инсулин Гларгин, клеточные методы, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. С. Головина разработала методику определения антител. Н. Б. Абраменко, П. И. Внукова и Е. С. Головина провели валидацию методики, выполнили определение нейтрализующих антител к инсулину в образцах, обработку данных. Н. Б. Абраменко, Е. С. Головина, П. В. Гремякова, А. Г. Никифорова, И. Е. Макаренко, А. А. Мосикян и В. И. Казей проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Абраменко Н. Б., Внукова П. И., Головина Е. С., Макаренко И. Е., Мосикян А. А., Никифорова А. Г., Гремякова П. В., Казей В. И. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к инсулину (гларгин) в плазме крови человека. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 70–78.

Development and Validation of Approach for the Detection of Neutralizing Antibodies Against Insulin (Glargine) in Human Blood Plasma

Natalia B. Abramenko^{1,2,3*}, Polina I. Vnukova^{3,4}, Elena S. Golovina³, Igor E. Makarenko⁵,
Anna A. Mosikian⁵, Aiyuna G. Nikiforova³, Polina V. Gremyakova³, Vasily I. Kazey³

1 – N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 47, Leninsky av., Moscow, 119991, Russia

2 – N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, 33, Leninsky av., Moscow, 119071, Russia

3 – LLC «Exact Labs», 20/2, Nauchny Proezd, Moscow, 117246, Russia

4 – K.I. Scriabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, Academician Scriabin str., Moscow, 109472, Russia

5 – LLC «GEROFARM», 9, Zvenigorodskaya str., Saint Petersburg, 191119, Russia

*Corresponding author: Natalia B. Abramenko. E-mail: n.abramenko@exactelabs.com

Received: 20.05.2019. Accepted: 02.07.2019

Abstract

Introduction. Immunogenicity identification of therapeutic proteins, such as human insulin analogues, is one of the most relevant and significant area in medicine and pharmaceuticals. Determination the possibility of producing neutralizing antibodies to insulin reducing the therapeutic effect of the drug, is an important step to understand the pharmacological profile of the drug. Applying of cell-based methods one allows to determinate neutralizing antibodies to insulin.

Aim. Development and validation methods for detection of neutralizing antibodies against insulin in human plasma.

Materials and methods. The method is based on the use of the *iLiteTM Insulin Assay Ready Cells* [1], in the genome of which the firefly luciferase reporter gene is introduced under the control of an insulin-dependent promoter. As the insulin concentration increases, the firefly luciferase expression (Firefly) increases, allowing one to use this cell line to estimate the number of neutralizing antibodies against insulin. For normalization by the number of cells and considering the matrix effect of studied samples, the second reporter gene luciferase Renilla is used, which is expressed under the control of a constitutive promoter. The activity of both luciferases was measured using the *DualGlo Luciferase Assay System (Promega)* assay [2].

Results and discussion. Optimal insulin concentration and plasma/serum dilution were determined to identify neutralizing antibodies to insulin. The long-term stability of neutralizing antibodies to insulin were shown in human plasma for more than 3 months. The developed method was applied in a comparative research of the safety and immunogenicity of insulin analogues (Glargine).

Method for the determination of antibodies to insulin was.

Conclusion. A method for determination of neutralizing antibodies to insulin in human K_2 EDTA plasma was developed and validated using *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* system; based on the binding of the insulin alpha chain to the high-affinity heterodimeric CD220 receptor.

Keywords: neutralizing antibodies, insulin glargine, cell-based methods, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena S. Golovina developed a methodology for the antibodies' determination. Natalia B. Abramenko, Polina I. Vnukova and Elena S. Golovina carried out the validation of the method and performed the determination of neutralizing antibodies to insulin in the samples and data processing of experiments. Natalia B. Abramenko, Elena S. Golovina, Polina V. Gremyakova, Aiyyna G. Nikiforova, Igor E. Makarenko, Anna A. Mosikian and Vasily I. Kazey participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

For citation: Abramenko N. B., Vnukova P. I., Golovina E. S., Makarenko I. E., Mosikian A. A., Nikiforova A. G., Gremyakova P. V., Kazey V. I. Development and validation of approach for the detection of neutralizing antibodies against insulin (glargine) in human blood plasma. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 70–78.

ВВЕДЕНИЕ

Для предотвращения и замедления прогрессирования диабета и связанных с ним осложнений важно проведение гликемического контроля. Инсулинотерапия является одним из самых эффективным решений контроля гликемического уровня у больных сахарным диабетом (СД). Рациональное и своевременное использование препаратов инсулина, генно-инженерных или аналогов инсулина позволяет достичь стойкой компенсации углеводного обмена, и тем самым предотвратить или замедлить прогрессирование осложнений СД 2 типа, а также повысить качество жизни пациентов [3]. Непременным условием эффективности инсулинотерапии при СД 1 типа служит адекватное введение препаратов инсулина, максимально приближенное к ритму секреции эндогенного инсулина. Однако, смоделировать близкие к физиологическим соотношения уровня гликемии и инсулинемии достаточно трудно [4].

За время своего существования препараты инсулина прошли эволюцию от природного инсулина, добываемого из поджелудочной железы домашних животных, до рекомбинантных препаратов и аналогов человеческого инсулина, к которым относится инсулин гларгин.

Инсулин гларгин отличается от человеческого инсулина добавлением двух остатков аргинина в конец В-цепи и заменой аспарагина на глицин в положении A21. Эти две модификации привели к созданию стабильной структуры, которая растворима в кислой среде при pH 4 и образует микропреципитаты при введении в подкожную клетчатку с нейтральным значением pH, что замедляет скорость всасывания. Добавление небольшого количества цинка стабилизирует образующиеся преципитаты, что приводит к дополнительному увеличению длительности действия препарата. В результате инсулин гларгин характеризуется замедленным поступлением в кровь без пиков концентрации в течение продолжительного времени и по своей фармакокинетике сходен с непрерывной подкожной инфузией инсулина [5].

Оригинальный лекарственный препарат инсулина гларгин, Лантус® («Санофи-Авентис Дойчланд ГмБХ», Германия), был выведен на рынок в 2000 г. [6]. За

последние несколько лет прошли клинические исследования и были выведены биоаналоги данного инсулина. В Европейском союзе к настоящему времени зарегистрировано 2 биосимиляра инсулина гларгин – Lusduna и ABASAGLAR® [6, 7]. Также биосимиляры аналогов инсулина выводятся и на локальные рынки, в том числе и России.

Использование терапевтических белков в качестве лекарственных препаратов, таких как препараты инсулина, связано с определенными рисками возникновения иммунного ответа в организме человека (иммуногенностью лекарства). Для доказательства безопасности применения таких препаратов проводят сравнительное исследование иммуногенности. Одним из нежелательным иммунным эффектом на применение лекарства является выработка нейтрализующих антител (НАТ) к препарату. Нейтрализующие антитела связывают лекарственный препарат, в таком случае препарат при попадании в организм не оказывает ожидаемого терапевтического эффекта. Определение образования НАТ к препарату имеет важное значение при исследовании иммуногенности терапевтических белков. Одним из наиболее чувствительных методов определения НАТ являются методики с использованием специальных клеточных линий.

В данной статье приведены результаты разработки и валидации методики оценки иммуногенности инсулинов в плазме крови человека. В рамках разработки и валидации метода была проведена адаптация методики по следующим показателям:

- установлен ответ клеточной линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* на стимуляцию инсулином, подобрана оптимальная концентрация инсулина для определения НАТ к инсулину;
- проанализировано влияние степени разбавления K_2 EDTA плазмы человека на уровень сигнала клеток к инсулину, установлена оптимальная степень разбавления плазмы для проведения анализа;
- показан нейтрализующий эффект референсных антител к инсулину;
- проведено сравнение ответа клеток на инсулин и нейтрализующие референсные антитела к инсулину при двух разных разведениях суспензии клеток;

- проанализирована долгосрочная стабильность нейтрализующих антител в K_2 EDTA плазме крови человека более 3-х месяцев при хранении образцов при температуре ниже -65°C .

Методика была применена при сравнительном исследовании безопасности и иммуногенности аналогов инсулина Гларгин тестируемого препарат: РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и препарат сравнения – Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Для разработки и адаптации метода использовали антитела Anti-Insulin antibody ab7842, производства «Abcam»; клеточная линия iLite™ Insulin Assay Ready Cells BM3060, «Euro Diagnostica», набор реактивов «Promega», Dual-Glo Luciferase Assay System, 100 ml, E2940, деионизованная вода, сопротивление 18 МОм · см, среда RPMI-1640 с глутамином, ПанЭко, кат. № С310п, сыворотка, HyClone, кат. № K052/SV30160.03; пенициллин/стрептомицин, ПанЭко, кат. № A065; инсулин, Sigma-Aldrich, кат. № I9278; плазма и сыворотка крови человека 6 доноров.

Тестируемый препарат: РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Препарат сравнения: Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия).

Клиническое исследование было проведено как многоцентровое, открытое, рандомизированное сравнительное исследование не худшей иммуногенности препаратов РинГлар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ») и инсулина Лантус® СолоСтар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ») у больных сахарным диабетом 1 типа. При этом исследование было заслепленным для аналитической лаборатории. На этикетках биологических образцов отсутствовала любая информация, позволяющая идентифицировать получаемый исследуемый препарат.

Основанием для проведения исследования являлось разрешение на клиническое исследования МЗ РФ № 282 от 14 июня 2018г и одобрение центрального этического комитета (выписка из протокола № 168 от 24 апреля 2018г).

Также, проведение исследования было одобрено в каждом клиническом центре независимыми этическими комитетами. Все пациенты до начала любых процедур исследования подписали форму информированного согласия на участие в исследовании.

Описание метода

Метод основан на использовании клеточной линии iLite™ Insulin Assay Ready Cells. Специфический ответ данной клеточной линии на инсулин выражается в экспрессии люциферазы светлячка (Firefly). Если в

исследуемом образце K_2 EDTA плазмы крови человека присутствуют нейтрализующие антитела к инсулину, то они связывают инсулин и наблюдается снижение экспрессии люциферазы Firefly, которое выражается в снижении люминесцентного сигнала в присутствии субстрата люциферазы Firefly. Для нормализации по количеству клеток и учёта влияния матричного эффекта исследуемых образцов использовали второй репортёрный ген люциферазы Renilla, который экспрессируется под контролем конститутивного промотора и сигнал которой пропорционален количеству клеток.

В качестве контроля тест-системы использовали антитела к инсулину Anti-Insulin antibody ab7842, которые обладают нейтрализующей активностью в отношении инсулина. Наличие нейтрализующих антител к инсулину в плазме человека определяли по соотношению сигналов двух люцифераз Firefly/Renilla.

Для проведения экспериментов использовали протоколы, предлагаемые производителями клеточной линии [8, 9]. В лунках белых 96-луночных планшетов Nunclon™ Delta Surface смешивали растворы референсных антител и инсулина, затем инкубировали 30 минут в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2 . После инкубации HAT с инсулином вносили в каждую лунку раствор рабочей суспензии клеток и перемешивали пипетированием. После добавления клеток планшеты инкубировали в течение 5 часов в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO_2 . После инкубации с клетками добавляли в каждую лунку рабочий раствор Dual-Glo Luciferase Reagent (субстрат люциферазы Firefly), перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут (сигнал устойчив в течение 2 часов после внесения субстрата [2]). Измеряли люминесцентный сигнал при всех длинах волн при помощи мультипланшетного ридера SpectraMax M5. В конце добавляли в каждую лунку рабочей раствор Dual-Glo Luciferase Stop&Glo Reagent (субстрат люциферазы Renilla), перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут (сигнал устойчив в течение 4-х часов после внесения субстрата [2]). Измеряли люминесцентный сигнал в каждой лунке планшета при всех длинах волн при помощи мультипланшетного ридера SpectraMax M5.

Приготовление калибровочных образцов и образцов контроля качества (КК)

При проведении эксперимента готовили серийное разведение HAT к инсулину. Серийные разведения референсных антител были приготовлены в диапазоне концентраций 80000 нг/мл – 110 нг/мл из исходного раствора 200 мкг/мл, с шагом разведения 3. Концентрационные кривые готовили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител (80000 нг/мл, 26666 нг/мл, 8888 нг/мл, 2963 нг/мл, 988 нг/мл, 329 нг/мл, 110 нг/мл и 0 нг/мл). Растворы референсных антител в разбавленной K_2 EDTA плазме крови человека смешивали с 20 мкл 4-кратного раствора инсулина (2 мкг/мл). После инкубации добавляли к смесям суспензию клеток iLite™ Insulin Assay Ready Cells.

При проведении эксперимента проводилось измерение сигналов люминесценции субстратов *Firefly* и *Renilla* в контрольных образцах в четырех повторах: сигнал в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) в присутствии инсулина (0% ингибирования) и без добавления инсулина (100% ингибирования). Аналитическая серия считалась приемлемой, если нейтрализующие антитела были обнаружены в положительных образцах КК (клетки без инсулина) и отсутствовали в отрицательных образцах КК. Сходимость полуэффективной концентрации (EC₅₀) для одной ампулы клеток использовали в качестве критерия приемлемости между несколькими аналитическими сериями.

Приготовление образцов

Перед началом анализа замороженные образцы размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе. Рабочие растворы анализируемых образцов готовили смешиванием 10 мкл плазмы каждого образца с 90 мкл среды RPMI с антибиотиком (пенициллин/стрептомицин).

Растворы разбавленной K₂ ЭДТА плазме крови пациента смешивали с 20 мкл 4-кратного раствора инсулина (2 мкг/мл). После инкубации добавляли к смесям суспензию клеток *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*. Определение нейтрализующего действия антител к инсулину (в присутствии 500 нг/мл инсулина) в тестируемых образцах проводилось только по калибровочной кривой, полученной в данной аналитической серии. При расчетах концентрации нейтрализующих антител к инсулину в плазме не учитывались выпадающие значения отношений сигналов люминесценции субстратов *Firefly* и *Renilla* с учетом относительного коэффициента отклика [2, п. 6].

Пороговым значением концентрации антител («cut point») для определения наличия антител к инсулину было выбрано 4-кратное значение концентрации антител в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) [11]. Образцы с концентрацией антител выше или равной этого значения считали содержащими нейтрализующие антитела к инсулину. В качестве иммунологического маркера (титра антител) сложилось превышение в 4 и более раз концентрации антител в отрицательных контрольных образцах [11].

Статистический анализ данных

Статистический анализ производили с применением языка программирования для статистической обработки данных R версии 3.5.0. Сравнение результатов измерений анализа на иммуногенность проводилось с помощью точного критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями нормативных документов [10]. В ходе валидации оценивали следующие метрологические характеристики: ответ клеточной линии на стимуляцию в зависимости от концентрации инсулина и в зависимости от степени разбавления плазмы крови

человека; ответ клеточной линии на стимуляцию инсулином (500 нг/мл) в зависимости от концентрации НАТ; валидировано разбавление клеток в два раза по сравнению с рекомендациями производителя; установлена долгосрочная стабильность НАТ в плазме крови человека >3 месяцев при хранении –65 °С.

Ответ клеточной линии к инсулину и выбор концентрации инсулина. Было проведено 2 независимых эксперимента на одной виале клеток в среде RPMI + 9% FBS¹ и цельной плазме крови человека (рисунк 1).

Из приведённых результатов видно, что инсулин человека в растворителе индуцирует экспрессию люциферазы *Firefly* с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC₅₀) 114,3 нг/мл и 104,9 нг/мл. С учетом нормирования сигнала на экспрессию люциферазы *Renilla* значение EC₅₀ составляет 122,8 нг/мл и 99,79 нг/мл. В неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека активации экспрессии люциферазы *Firefly* не наблюдается. Максимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly* достигается при концентрации инсулина 500 нг/мл и выше, данная концентрация была выбрана для экспериментов на определение наличия НАТ к инсулину.

Нейтрализующий эффект референсных антител. Концентрационные кривые по референсным антителам *Abcam* (Ab7842) строили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител к инсулину. Растворы референсных антител в растворителе или K₂EDTA плазме крови человека смешивали с 4-кратным раствором инсулина (2 мкг/мл). После инкубации в течение 30 минут в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5% CO₂ добавляли к смесям суспензию клеток *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*. Было проведено две независимые серии эксперимента на одной виале клеток в среде RPMI + 9% FBS и цельной плазме крови человека (рисунк 2).

Из приведённых данных видно, что референсные антитела к инсулину нейтрализуют активацию экспрессии люциферазы *Firefly*. Сигнал экспрессии люциферазы *Firefly* и соотношение сигналов люминесценции двух люцифераз *Firefly/Renilla* находятся в обратной концентрационной зависимости в отношении НАТ к инсулину. В неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека активации экспрессии люциферазы *Firefly* не наблюдается и нейтрализующее действие антител невозможно идентифицировать.

Степень разбавления плазмы. Так как в неразбавленной K₂EDTA плазме крови человека инсулин не активирует экспрессию люциферазы *Firefly* в клетках линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* были протестированы серии разбавлений K₂EDTA плазмы и сыворотки здорового добровольца. Неразбавленные плазма/сыворотка и разбавления плазмы/сыворотки в 2,5 раза, в 5 раз и в 10 раз были протестированы для трёх концентраций инсулина: 1) 500 нг/мл (максимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly*), 2) 125 нг/мл (полумаксимальная активация экспрессии люциферазы *Firefly*); 3) 16 нг/мл (низкая активация экспрессии лю-

¹FBS – сыворотка (fetal bovine serum).

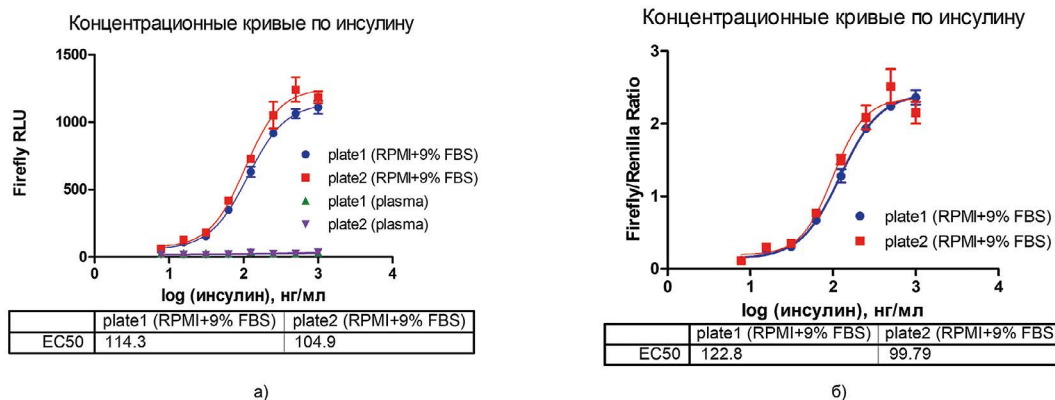


Рисунок 1. а – концентрационные кривые по инсулину в разных растворителях (расчёт по люминесценции Firefly); б – концентрационные кривые по инсулину в разных растворителях (расчёт по отношению люминесценции Firefly/Renilla)

Figure 1. а – concentration curves of insulin in different solvents (luminescence of Firefly); б – concentration curves of insulin in different solvents (Firefly / Renilla luminescence ratio)

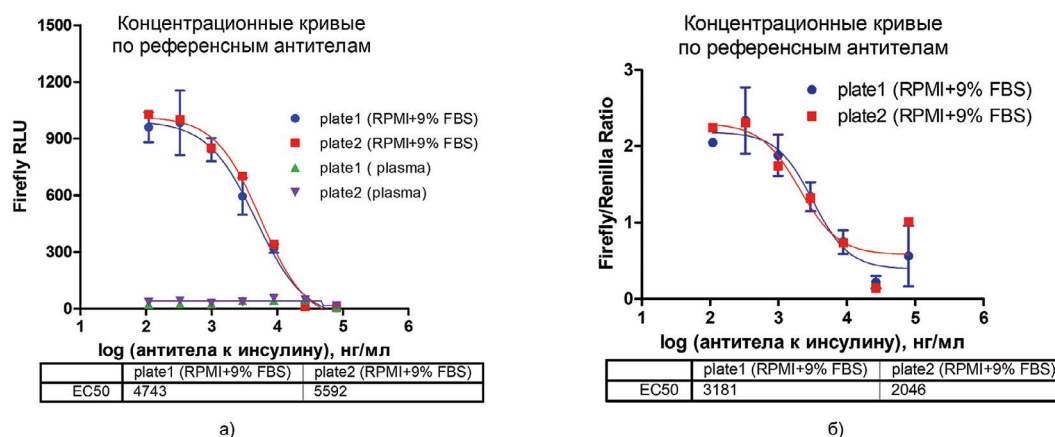


Рисунок 2. а – Концентрационные кривые по референсным антителам (расчёт по люминесценции Firefly); б – Концентрационные кривые по референсным антителам (расчёт по отношению люминесценции Firefly/Renilla)

Figure 2. а – Concentration curves of reference antibodies (Firefly luminescence); б – Concentration curves for reference antibodies (Firefly / Renilla luminescence ratio)

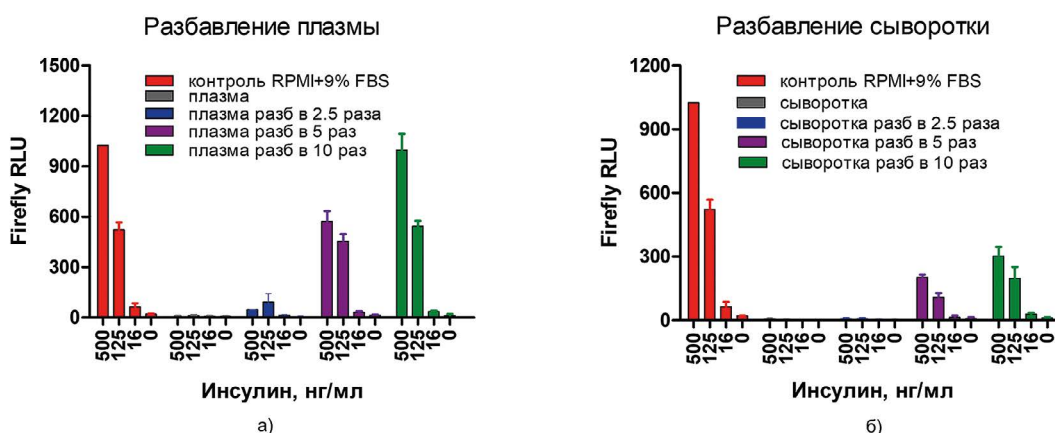


Рисунок 3. а – Активация экспрессии люциферазы Firefly в разных разбавлениях контрольной K_2 EDTA плазмы (расчёт по люминесценции Firefly); б – Активация экспрессии люциферазы Firefly в разных разбавлениях контрольной сыворотки (расчёт по люминесценции Firefly)

Figure 3. а – Firefly luciferase expression in different dilutions of the control K_2 EDTA plasma (Firefly luminescence); б – Firefly luciferase expression in different dilutions of control serum (Firefly luminescence)

циферазы *Firefly*). Для контроля специфичности сигнала для каждого разбавления сыворотки и плазмы был протестирован контрольный образец без добавления инсулина к клеткам. Для контроля всей модельной системы использовали активацию экспрессии люциферазы *Firefly* в растворителе (среда RPMI 1640 + 9% FBS) с теми же концентрациями инсулина. Результаты экспериментов представлены на рисунке 3.

Из приведённых результатов видно, что в неразбавленной плазме и сыворотке инсулин человека в растворителе не индуцирует экспрессию люциферазы *Firefly*, а при увеличении степени разбавления плазмы и сыворотки наблюдается увеличение активирующей способности инсулина. При разбавлении контрольной K_2 EDTA плазмы в 10 раз активирующая способность

инсулина сопоставима с активирующей способностью в растворителе (среда RPMI 1640 + 9% FBS).

Разбавление суспензии клеток. Для определения зависимости чувствительности метода от разбавления клеток были протестированы два разбавления клеток линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells*: 1) разбавление, рекомендованное производителем клеток; 2) разбавление в 2 раза больше, рекомендованного производителем клеток. Для обоих разбавлений клеток были получены концентрационные кривые по инсулину и референсным НАТ. Результаты экспериментов представлены на рисунках 4–5.

Из приведённых данных можно сделать вывод, что увеличение разбавления клеток линии *iLite™ Insulin Assay Ready Cells* в 2 раза по сравнению с разбавлением, рекомендованным производителем не приводит

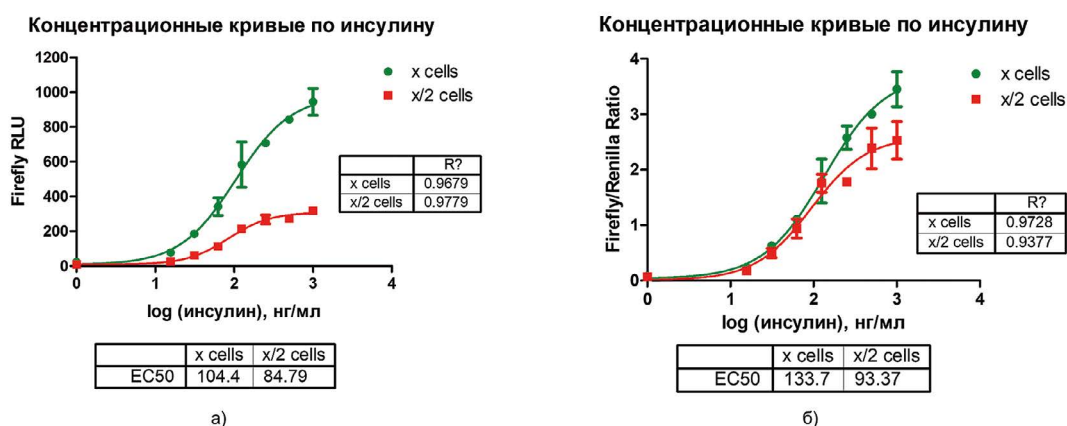


Рисунок 4. А – Активация инсулином экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по люминесценции *Firefly*); Б – Активация инсулином экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по отношению люминесценции *Firefly*/*Renilla*)

Figure 4. А – *Firefly* luciferase expression in different cell dilutions (*Firefly* luminescence); б – *Firefly* luciferase expression in different cell dilutions (*Firefly*/*Renilla* luminescence ratio)

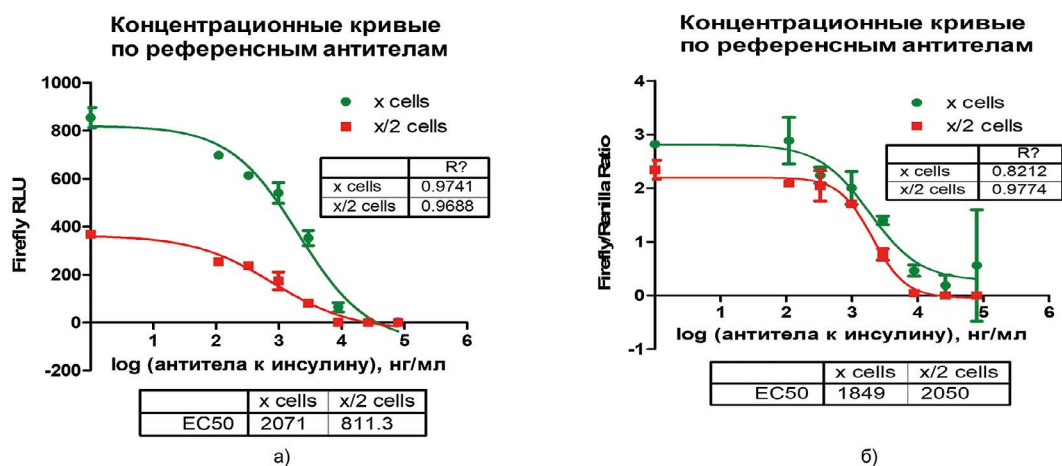


Рисунок 5. А – Ингибирование референсными антителами экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по люминесценции *Firefly*); Б – Ингибирование референсными антителами экспрессии люциферазы *Firefly* в разных разбавлениях клеток (расчёт по отношению люминесценции *Firefly*/*Renilla*)

Figure 5. А – Inhibition of the expression of *Firefly* luciferase by reference antibodies at different cell dilutions (*Firefly* luminescence); б – Inhibition of *Firefly* luciferase expression by reference antibodies at different cell dilutions (*Firefly* / *Renilla* luminescence ratio)

к уменьшению чувствительности метода. Таким образом, это разбавление клеток можно использовать при тестировании образцов.

Долгосрочная стабильность. Для определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в плазме крови человека более 3-х месяцев были проанализированы образцы с известной концентрацией НАТ [образцы контроля качества (КК)] в день приготовления и спустя 76 и 112 дней после заморозки (2,5 и >3,5 месяца соответственно). В качестве образцов КК использовали образцы с высокой и средней концентраций НАТ (НQC и MQC соответственно). Длительное хранение образцов проводилось при температуре ниже -65 °C. Результаты анализа долгосрочной стабильности образцов приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Результаты определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в образцах КК спустя 2,5 месяца

Table 1. Long-term stability of neutralizing antibodies in samples of quality control samples after 2.5 months

Образец КК	Соотношение сигналов FireFly/Renilla	Номинальная концентрация	Определённая концентрация (антител), нг/мл	Точность, %	Наличие антител
MQC	1,18	1000	1021,41	102,14%	+
HQC	0,63	5000	5281,64	105,63%	+

Так как в экспериментах использовались разные ампулы клеток, точность определения для разных аналитических серий устанавливали по соотношению сигналов люцифераз *FireFly/Renilla* в образцах КК.

Таблица 2. Результаты определения долгосрочной стабильности нейтрализующих антител в образцах КК спустя >3,5 месяцев

Table 2. Long-term stability of neutralizing antibodies in samples of quality control samples after >3,5 months

Образец КК	Соотношение сигналов FireFly/Renilla первое измерение	Соотношение сигналов FireFly/Renilla второе измерение	Точность, %
MQC	1,18	1,12	94,85
HQC	0,63	0,63	100,32

Таким образом было показано, что при анализе образцов плазмы крови человека допустимо хранение образцов при температуре ниже -65 °C сроком более 3-х месяцев. Результаты для образцов на долгосрочную стабильность удовлетворяют принятым критериям валидации.

Определение нейтрализующих антител к инсулину в образцах. После валидации метод был опробован при анализе реальных проб на определение НАТ в К₂ EDTA плазмы больных СД 1 типа в рамках сравнительного исследования иммуногенности препаратов Рин-Глар®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл (ООО «ГЕРОФАРМ») и инсулина Лантус®, раствор для подкожного введения, 100 ЕД/мл («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ»).

Анализ реальных проб были разделены на аналитические серии. Каждая серия включала в себя образцы калибровочной кривой для референсных антител в двух повторах, 4 положительных образца КК (клетки без инсулина) и 4 образца отрицательных КК (клетки с инсулином) и тестируемые образцы для определения НАТ к инсулину. Количественную оценку активности референсных нейтрализующих антител *Abcam* (Ab7842) проводили при конечной концентрации инсулина 500 нг/мл с использованием 7 концентраций референсных антител (80000 нг/мл, 26666 нг/мл, 8888 нг/мл, 2963 нг/мл, 988 нг/мл, 329 нг/мл, 110 нг/мл и 0 нг/мл). Результаты анализа образцов КК для каждой аналитической серии представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Среднее значения отношения сигналов люцифераз *Firefly/Renilla* для положительных и отрицательных контролей, полуэффективная концентрация и пороговое значение титра антител аналитической серии определения нейтрализующих антител к инсулину в плазме крови пациентов

Table 3. The average value of the of *Firefly/Renilla* luciferase ratio for positive and negative controls, the semi-effective concentration and the cut points value of the antibody titer of an analytical series for the determination of neutralizing antibodies to insulin in the blood plasma of patients

Аналитическая серия	Параметр аналитической серии	Среднее значение соотношения сигналов FireFly/Renilla	Средняя концентрация (антител), нг/мл	Наличие антител к инсулину ¹
1 ампула клеток: кол-во клеток $3,8 \cdot 10^5$ мл; 96% живых клеток				
№ 1	Cells	0,27	55456,74	+
	Cells + Insulin	1,88	911,23	нет
	Cut point	3644,91 нг/мл		
	EC50	3292 нг/мл		
№ 2	Cells	0,22	ULOQ	+
	Cells + Insulin	2,33	442,55	нет
	Cut point	1770,22 нг/мл		
	EC50	2887 нг/мл		
2 ампула клеток: кол-во клеток $3,0 \cdot 10^5$ мл; 88% живых клеток				
№ 4	Cells	0,38	1681,19	+
	Cells + Insulin	1,95	107,48	нет
	Cut point	500,05 нг/мл		
	EC50	1540 нг/мл		
3 ампула клеток: кол-во клеток $2,3 \cdot 10^5$ мл; 96% живых клеток				
№ 5	Cells	0,13	55867,55	+
	Cells + Insulin	1,75	159,80	нет
	Cut point	639,19 нг/мл		
	EC50	1159 нг/мл		
№ 6	Cells	0,21	17796,04	+
	Cells + Insulin	2,01	202,08	нет
	Cut point	808,31 нг/мл		
	EC50	1035 нг/мл		
№ 7	Cells	0,12	102257,16	+
	Cells + Insulin	1,95	167,74	нет
	Cut point	670,95 нг/мл		
	EC50	844,4 нг/мл		

Приложение. ¹Данные представлены для 4-х повторов образцов КК.

Cells – положительный контроль.

Cells+Insulin – отрицательный контроль.

Cut point – пороговое значение.

Note. ¹Data are presented for 4 repeats of samples of KK.

Cells – positive control.

Cells + Insulin – negative control.

Cut point – the threshold value.

Пороговым значением концентрации антител («cut points») для определения наличия антител к инсулину было выбрано четырех кратное увеличение концентрации НАТ по сравнению с концентрацией НАТ в пулированной плазме здоровых добровольцев (N=6) [11]. Маркером титра антител служило превышение в 4 раза и более концентрации антител в отрицательных контрольных образцах – клетки с инсулином.

Для контроля качества получаемых результатов в процессе анализа проб пациентов использовали показатели наличия и отсутствия НАТ к инсулину в образцах КК и по сходимости отношения средних сигналов люцифераз *Firefly* и *Renilla* в отрицательных образцах КК [12] и в первой точке калибровочной кривой (бланк), которые анализировали вместе с тестируемыми образцами в каждой аналитической серии.

Таблица 4. Средние значения отношения сигналов люцифераз *Firefly/Renilla* для отрицательных контролей и первой точки калибровочной кривой

Table 4. Average values of the *Firefly / Renilla* luciferase ratio for negative controls and the first calibration curve points

Аналитическая серия	Параметр	Среднее значение соотношения сигналов	Точность (K1/Cells+Insulin), %
№ 1	K1	1,87	99,63
	Cells+Insulin	1,88	
№ 2	K1	2,01	86,19
	Cells+Insulin	2,33	
№ 4	K1	1,77	90,89
	Cells+Insulin	1,95	
№ 5	K1	1,86	106,27
	Cells+Insulin	1,75	
№ 6	K1	2,30	114,56
	Cells+Insulin	2,01	
№ 7	K1	2,12	108,93
	Cells+Insulin	1,95	

Приложение. В таблице приведены округленные значения. Критерий приемлемости для точности 100±20%. Cells+Insulin – отрицательный контроль. K1 – первая точка калибровочной кривой (бланк).

Note. The table shows rounded values. Acceptance criterion for accuracy is 100±20%. Cells + Insulin – negative control. K1 – the first point of the calibration curve (blank).

Полученные результаты определения наличия НАТ к инсулину для образцов КК свидетельствует о приемлемости данного аналитического метода для анализа проб пациентов, а также о достоверности полученных результатов определения НАТ к инсулину в образцах плазмы крови человека. Поступившие в лабораторию образцы плазмы крови пациентов были разделены на аналитические серии. Концентрации в

реальных пробах рассчитывали по кривым, полученным в результате анализа калибровочных образцов в текущей серии.

Оценку иммуногенности проводили по частоте возникновения иммунного ответа (на основании определения концентрации НАТ к инсулину). Результаты тестирования проб пациентов на определение возникновения иммунного ответа представлены в таблице 5.

Таблица 5. Частота появления НАТ у больных СД 1 типа

Table 5. The frequency of occurrence of NAT in patients with type 1 diabetes

Визит	Появление НАТ к инсулину	РинГлар® (N=90)	Лантус® СолоСтар® (N=90)	p-value ¹
		n (% ²)	n (%)	
Визит 1	Да	26 (28,89%)	27 (30,00%)	1,000
	Нет	63 (70,00%)	62 (68,89%)	
Визит 9	Да	23 (25,56%)	24 (26,67%)	1,000
	Нет	65 (72,22%)	66 (73,33%)	

Примечание. ¹Точный критерий Фишера.

²Количество проанализированных образцов для 1 и 9 визита отличается, в связи с исключением пациентов в 9 визите в исследовании (поэтому сумма % не равна 100).

Note. ¹Exact Fisher criterion.

²The number of samples analyzed for visits 1 and 9 is different, due to the exclusion of patients at visit 9 in the study (therefore, the sum % is not equal to 100).

Общее количество образцов на исследование иммуногенности составило 356 шт. Нейтрализующие антитела к инсулину были идентифицированы у 53 и 47 при первом визите и девятом визите соответственно, у остальных пациентов НАТ к инсулину не было обнаружено.

Статистически значимых отличий частоты обнаружения НАТ между группами при первом и последнем визите (9 визит) не выявлено. По результатам определения наличия НАТ к инсулину у больных СД 1 наблюдаемая частота возникновения иммунного ответа одинакова для групп, принимающих разные препараты как до начала исследования, так и спустя 26 недель от начала исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения работ по разработке и валидации биоаналитического метода определения НАТ к инсулину в тест-системе на основе клеточной линии *iLite™* Insulin Assay Ready Cells был продемонстрирован нейтрализующий эффект референсных антител к инсулину. Показано, что стимуляция инсулином данной клеточной линии активирует экспрессию люциферазы *Firefly*. Наблюдаемый активирующий эффект инсулина в данной тест-системе нейтрализуется референсными антителами к инсулину.

В процессе валидации показано, что в присутствии неразбавленной K₂ EDTA плазмы и сыворотки человека активирующий эффект инсулина в данной тест-системе

ме не наблюдается. При разбавлении K_2 EDTA плазмы и сыворотки человека инсулин проявляет активирующие свойства в данной тест-системе и активирующий эффект инсулина зависит от степени разбавления плазмы и сыворотки. Показано, что в разбавленной в 10 раз K_2 EDTA плазме активирующий эффект инсулина равен активирующему эффекту в растворителе и это разбавление может использоваться для тестирования образцов. Также проведено сравнение ответа клеток на инсулин и нейтрализующие референсные анти-тела к инсулину при двух разных разведениях клеток. Было показано, что разбавление клеток линии iLite™ Insulin Assay Ready Cells в 2 раза по сравнению с рекомендованным производителем клеток разбавлением не приводит к снижению чувствительности метода и может использоваться для тестирования образцов. По результатам валидации продемонстрирована долгосрочная стабильность НАТ в K_2 EDTA плазме крови человека более 3-х месяцев при хранении образцов при температуре ниже -65°C . Полученные результаты показывают, что данная методика может использоваться при исследовании иммуногенности лекарственных препаратов, содержащих инсулин.

По результатам определения наличия НАТ к инсулину у больных СД 1 типа от начала исследования до 26 недель была продемонстрировано идентичная иммуногенность тестируемого препарата РинГлар (ООО «ГЕРОФАРМ») по сравнению с инсулином Лантус («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ»).

ЛИТЕРАТУРА

1. iLite™ Insulin Assay Ready Cells (REF: BM3060), Product specification (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-165-GB01). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/BM3060%20Product%20Specification%20iLite%20Insulin%20Assay%20Ready%20Cells%20LABEL-DOC-0362%20v1%200.pdf>.
2. Dual-Glo® Luciferase Assay System Technical Manual (Promega) Available at: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?la=en>.
3. Аметов А. С., Карпова Е. В. Современный взгляд на инсулинотерапию у больных сахарным диабетом 2 типа в ежедневной клинической практике врача-эндокринолога. *Эндокринология*. 2008; 495: 71–5.
4. Авакова К. А. Оптимизация методов современной инсулинотерапии при лечении сахарного диабета. *Автореф дисс. канд. мед. наук*. 2009.
5. McKeage K., Goa K. L. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00007>.
6. Davies M., Dahl D., Heise T., Kiljanski J., Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabetic Medicine*. 2017; 34(10): 1340–1353. <https://doi.org/10.1111/dme.13400>.
7. European Medicines Agency. Abasaglar Insulin Glargine. EPAR Summary for the Public, 2014. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_thepublic/human/002835/WC500175384.pdf.
8. Determination of anti-Insulin neutralizing antibodies using iLite™ Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-183-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Determination%20of%20anti-insulin%20neutralizing%20antibodies%20LABEL-DOC-0390%20v1%200.pdf>.
9. Quantification of Insulin using iLite™ Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-182-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Quantification%20of%20Insulin%20LABEL-DOC-0389%20v1%200.pdf>.
10. FDA/CDER/CBER. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry. FDA. 2019.
11. Home P., Derwahl K.-M., Ziemer M., Wernicke-Panten K., Pierre S., Kirchheide Y., Garg S. K. Anti-Insulin Antibodies and Adverse Events with Biosimilar Insulin Lispro Compared with Humalog Insulin Lispro in People with Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2018; 20: 160–170. <https://doi.org/10.1089/dia.2017.0373>.
12. Chatterjee S., Vashishta L., Waichale V. S., Nayak V. G., Melarkode R., Donnelly C. M., Sengupta N. Development and validation of a cell-based assay for the detection of neutralizing antibodies against recombinant insulins. *J. Immunol. Methods*. 2017; 452: 53–62. doi:10.1016/j.jim.2017.09.004.

REFERENCES

1. Dual-Glo® Luciferase Assay System Technical Manual (Promega) Available at: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?la=en>.
2. iLite™ Insulin Assay Ready Cells (REF: BM3060), Product specification (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-165-GB01). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/BM3060%20Product%20Specification%20iLite%20Insulin%20Assay%20Ready%20Cells%20LABEL-DOC-0362%20v1%200.pdf>.
3. Ametov A. S., Karpova E. V. A modern view on insulin therapy in patients with type 2 diabetes in the daily clinical practice of an endocrinologist. *Endokrinologiya*. 2008; 495: 71–5 (in Russ.).
4. Avakova K. A. Optimization of methods of modern insulin therapy in the treatment of diabetes. PhD thesis. 2009 (in Russ.).
5. McKeage K., Goa K. L. Insulin glargine. *Drugs*. 2001; 61(11): 1599–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00007>.
6. Davies M., Dahl D., Heise T., Kiljanski J., Mathieu C. Introduction of biosimilar insulins in Europe. *Diabetic Medicine*. 2017; 34(10): 1340–1353. <https://doi.org/10.1111/dme.13400>.
7. European Medicines Agency. Abasaglar Insulin Glargine. EPAR Summary for the Public, 2014. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_thepublic/human/002835/WC500175384.pdf.
8. Determination of anti-Insulin neutralizing antibodies using iLite™ Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-183-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Determination%20of%20anti-insulin%20neutralizing%20antibodies%20LABEL-DOC-0390%20v1%200.pdf>.
9. Quantification of Insulin using iLite™ Insulin Assay Ready Cells, Application note (Euro Diagnostica AB, Doc No: E-182-GB00). Available at: <https://www.eurodiagnostica.com/downloadFile.php?fileName=upload/files/fileLibrary/Application%20note%20-%20Quantification%20of%20Insulin%20LABEL-DOC-0389%20v1%200.pdf>.
10. FDA/CDER/CBER. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry. FDA. 2019.
11. Home P., Derwahl K.-M., Ziemer M., Wernicke-Panten K., Pierre S., Kirchheide Y., Garg S. K. Anti-Insulin Antibodies and Adverse Events with Biosimilar Insulin Lispro Compared with Humalog Insulin Lispro in People with Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2018; 20: 160–170. <https://doi.org/10.1089/dia.2017.0373>.
12. Chatterjee S., Vashishta L., Waichale V. S., Nayak V. G., Melarkode R., Donnelly C. M., Sengupta N. Development and validation of a cell-based assay for the detection of neutralizing antibodies against recombinant insulins. *J. Immunol. Methods*. 2017; 452: 53–62. doi:10.1016/j.jim.2017.09.004.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-79-84>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных

Е. Н. Фишер^{1,2*}, Е. С. Мельников^{1,3}, И. Е. Шохин²

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

2 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3

3 – ГБУ города Москвы «Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы», 119027, Россия, г. Москва, ул. Яузская, д. 11

*Контактное лицо: Фишер Елизавета Николаевна. E-mail: elizaveta.fisher@mail.ru

Статья получена: 01.07.2019. Статья принята к печати: 12.08.2019

Резюме

Введение. Бусерелин, синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона, используется в лечении таких гормонально-зависимых опухолей, как рак предстательной железы и рак молочной железы. На основании опубликованных научных трудов основным аналитическим методом количественного определения бусерелина в биологической жидкости является высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием с использованием в качестве пробоподготовки осаждение белков 10% раствором трихлоруксусной кислоты, который имеет ряд ограничений, связанных с низкой чувствительностью (на уровне мкг/мл). Таким образом, предпочтение в выборе метода количественного определения пептидной молекулы в биологических жидкостях отдавалось высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, обладающей большей точностью и специфичностью. Основным методом пробоподготовки для аналогов гонадотропин-рилизинг гормона является твердофазная экстракция. В качестве альтернативы был выбран метод осаждения белков, как менее трудоемкий и более простой в исполнении.

Цель. Цель исследования заключалась в разработке и валидации методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных (мини-свиней) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение бусерелина в плазме крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Осаждение белков метанолом в соотношении 1:2 использовали в качестве метода пробоподготовки биологической жидкости.

Результаты и обсуждения. Разработанная биоаналитическая методика была валидирована по таким валидационным параметрам, как селективность, линейность, эффект матрицы, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), нижний предел количественного определения, перенос пробы и стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения бусерелина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 1,0–20 нг/мл. Разработанная методика может быть использована для количественного определения бусерелина в плазме крови с целью исследования фармакокинетики.

Ключевые слова: пептиды, бусерелин, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС, аналог гонадотропин-рилизинг гормона, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Е. Н. Фишер, Е. С. Мельников придумали и разработали эксперимент. Автор Е. Н. Фишер проводил расчеты и участвовал в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Фишер Е. Н., Мельников Е. С., Шохин И. Е. Разработка и валидация методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 79–84.

Development and Validation of HPLC-MS/MS Method for Busereline Quantitation in Animal Blood Plasma

Elizaveta N. Fisher^{1,2*}, Evgeniy S. Melnikov^{1,3}, Igor E. Shohin²

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

2 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Clinical Hospital. I. V. Davidovsky Department of Health of the city of Moscow, 11, Yauzskaya str. Moscow, 119027, Russia

*Corresponding author: Elizaveta N. Fisher. E-mail: elizaveta.fisher@mail.ru

Received: 01.07.2019. Accepted: 12.08.2019

Abstract

Introduction. Busereline, being a synthetic gonadotropin-releasing hormone analog, is widely used for hormone-dependent cancer treatment (e.g. prostate cancer and breast cancer). Based on the accumulated scientific data for busereline quantitation in biosamples, the main analytical method that is used for this purpose is high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, combined with protein precipitation (TCA 10%) for sample preparation. However, due to several limitations of this method resulting in low sensitivity (at the µg/mL level of concentrations), the HPLC-MS/MS analytical method was chosen for peptide determination in biosamples. The HPLC-MS/MS method is considered to have higher accuracy and specificity. The main sample preparation method for gonadotropin-releasing hormone analogs is solid-phase extraction. In our work, we've chosen protein precipitation as an alternative – easier and less laborious biosamples preparation process.

Aim. The main objective of this study was the development and validation of HPLC-MS/MS method for busereline quantitation in animal (mini pigs) plasma samples and its further application to pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Busereline quantitative determination in plasma samples was performed using HPLC-MS/MS method. A protein precipitation procedure (methanol, 1:2, v/v) was used for busereline extraction from pig plasma.

Results and discussion. The developed analytical method was validated for selectivity, linearity, matrix effect, accuracy (intra-day, inter-day), precision (intra-day, inter-day), LLOQ, carryover and stability.

Conclusion. A new HPLC-MS/MS method for busereline quantitation in blood plasma was developed and successfully validated. The developed method showed linearity over the quantitation range from 1 to 20 ng/mL. The developed method can be successfully applied to busereline pharmacokinetic studies.

Keywords: peptides, busereline, pharmacokinetics, HPLC-MS/MS, gonadotropin-releasing hormone analogs, validation.

© Фишер Е. Н., Мельников Е. С., Шохин И. Е., 2019

© Fisher E. N., Melnikov E. S., Shohin I. E., 2019

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Elizaveta N. Fisher, Evgeniy S. Melnikov invented and developed the experiment. Author Elizaveta N. Fisher made calculations and participated in the writing of the text article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Fisher E. N., Melnikov E. S., Shohin I. E. Development and validation of HPLC-MS/MS method for busereline quantitation in animal blood plasma. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 79–84.

ВВЕДЕНИЕ

Бусерелин – синтетический нонапептидный аналог ГнРГ (6-[0-(1,1-Диметилэтил)-D-серин]-9-(N-этил-L-пролинамид)-10-деглицинамид релизинг-фактора ЛГ (свиного)) с аминокислотной последовательностью H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(But)-Leu-Arg-Pro-NHEt [1]. Структурная формула бусерелина представлена на рисунке 1.

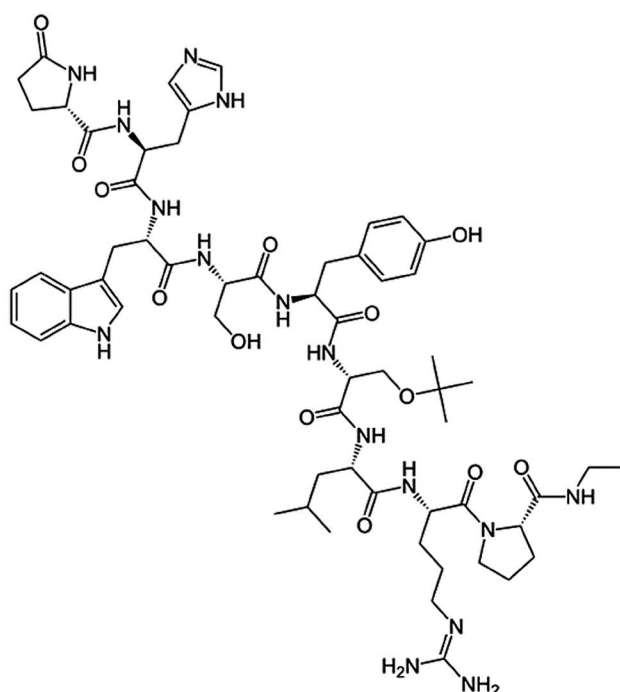


Рисунок 1. Структурная формула бусерелина
Figure 1. The structural formula of busereline

Аналоги ГнРГ (аГнРГ) вызывают подавления функции половых желез через гипотазарную десенсибилизацию путем непрерывного воздействия на рецепторы гипотазы и являются одной из ведущих групп препаратов, применяемых в терапии гормонально-за-

висимых опухолей таких, как рак предстательной железы и рак молочной железы [2]. По своей структуре аГнРГ относятся к коротким пептидам из-за наличия небольшого количества аминокислотных остатков (не более 20–30) [3]. В результате замены аминокислотных остатков синтетические аГнРГ имеют более выраженное сродство к рецепторам ГнРГ, продолжительный период полувыведения и сильное фармакологическое действие по сравнению с нативным гормоном. В ходе этого активность увеличивается в несколько десятков раз, а период полувыведения возрастает до 2 часов [4].

Сравнительная характеристика аминокислотного состава бусерелина и ГнРГ представлена в таблице 1.

Учитывая строение пептидной молекулы, ее физико-химические свойства, основными методами количественного определения коротких пептидов являются иммунохимический анализ [5], капиллярный электрофорез [6] и виды жидкостной хроматографии [7]. Несмотря на высокую чувствительность иммунохимического метода (на уровне пг/мл), он обладает рядом недостатков, которые заключаются в отсутствии абсолютной селективной, наличии перекрестных реакций с другими молекулами пептидной структуры, что может привести к ложноположительным результатам [8]. Такие аналитические методы, как хроматография и капиллярный электрофорез в сочетании с ФЛД и УФ-детектированием имеют достаточно ограниченную область применения при анализе биологической жидкости. Концентрация анализируемых веществ в таком материале должна иметь высокие значения, чтобы преодолеть влияние матрицы, в то время как концентрация пептидов в крови обычно находится на низком уровне [9]. Таким образом, предпочтение в анализе пептидных молекул в биологических жидкостях отдается высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) с методом ионизации электрораспылением в режиме положительной полярности, так как пептиды обычно являются достаточно полярными молекулами, способными легко протонироваться.

Таблица 1. Аминокислотный состав природного ГнРГ и бусерелина

Table 1. Amino acid composition of natural GnRH and busereline

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ГнРГ	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly
Бусерелин	H-Pyr	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser(But)	Leu	Arg	Pro	

But = tert-butyl; pGlu = pyroglutamic acid

В приведенных работах [11–13] твердофазная экстракция (ТФЭ) является основным методом пробоподготовки для достижения более низких значений нПКО. Альтернативным вариантом был выбран метод осаждения белков, где в качестве осаждающих реактивов применялись метанол, ацетонитрил и 10% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Использование ацетонитрила приводило к неполному извлечению аналита, а 10% раствор ТХУ обеспечивал извлечение аналита только при работе с высокими концентрациями (на уровне мкг/мл). В приведенном исследовании в качестве метода пробоподготовки биологической жидкости использовали осаждение белков метанолом в соотношении 1:2, как более простой в исполнении и позволяющий достичь требуемого уровня нПКО.

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке зарегистрировано две лекарственных формы (ЛФ) бусерелина – спрей назальный дозированный и лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения пролонгированного действия. Последняя является основной ЛФ для курсового лечения онкологических заболеваний длительностью в один месяц (28 дней). Однако длительность курсового лечения может быть увеличена до трех и шести месяцев, что в свою очередь приводит к разработке новой дозировки с целью сокращения частоты дозирования.

Цель исследования заключается в разработке и валидации методики количественного определения бусерелина в плазме крови животных (мини-свиней) для исследований фармакокинетики в рамках проведения доклинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и МС-детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera (Shimadzu, Япония), оснащенный дегазатором (DGL-20A5R), градиентным насосом (LC-30AD), термостатируемым автосамплером (SIL-30AC), термостатом колонок (CTO-20AC), диодно-матричным (SPD-M20A) и tandemным масс-спектрометрическим детектором (LCMS-8040) (Shimadzu, Япония) под управлением программного обеспечения LabSolution (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation.

Реактивы и растворы

В ходе исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve, Израиль); метанол (HPLC-grade, Panreac, Испания); кислота муравьиная (Extra pure, Sigma, США); вода Milli-Q. Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы стандартные образцы бусерелина ацетат (№ 68630-75-1, B3303, Sigma, США, годен до

10.2019) и даларгина ацетат (№ 81733-79-1, American Custom Chemicals Corporation, США, годен до 02.2019), который был выбран в качестве внутреннего стандарта (ВС).

Исходные стандартные растворы бусерелина и ВС готовили путем растворения навесок стандартных образцов в смеси ацетонитрил:вода (1:1). Рабочие стандартные растворы бусерелина готовили путем разведения исходного раствора тем же растворителем.

Исходные растворы, рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

Пробоподготовка была проведена способом осаждения белков метанолом в соотношении 1:2. 400 мкл интактной плазмы (либо 360 мкл с прибавлением 40 мкл раствора стандартного образца) помещали в пробирку типа Eppendorf, прибавляли 10 мкл ВС (2000 нг/мл) и 800 мкл метанола. Затем пробы встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 15 минут при 14500 об/мин, после чего супернатант переносили в хроматографические вials.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Условия хроматографического разделения были подобраны экспериментально.

Хроматографическая колонка: Jupiter® 5 мкм C18 50 x 4,6 мм 300 Å.

Температура термостата: 40 °С.

Подвижная фаза: 0,1% раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (элюент В) в градиентном режиме элюирования со скоростью потока 1,2 мл/мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Таблица 2. Режим градиентного элюирования

Table 2. Gradient elution

Время, мин	Объемная доля элюента В, %
0–0,3	5
0,3–4,6	5–35
4,6–5,1	35–95
5,1–6,5	95
6,5–8,2	95–5
8,2–10	5

Параметры детектирования были установлены экспериментально. Детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при положительной ионизации электрораспылением (ESI), 5кВ. В качестве распыляющего и осушающего газа использовался азот со скоростью 3 л/мин и 20 л/мин,

температура блока нагрева – 400 °С, линии десольватации – 200 °С.

Общее время анализа составило 10 мин. Время удерживания бусерелина – около 4,82 мин, даларгина – около 3,89 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Валидация методики

Валидация биоаналитической методики была проведена на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [14], а также руководств FDA [15] и EMA [16] по следующим параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), нижний предел количественного определения, перенос пробы и 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

Селективность методики была оценена путем анализа 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, и образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов бусерелина и ВС. На хроматограммах (рисунки 2 и

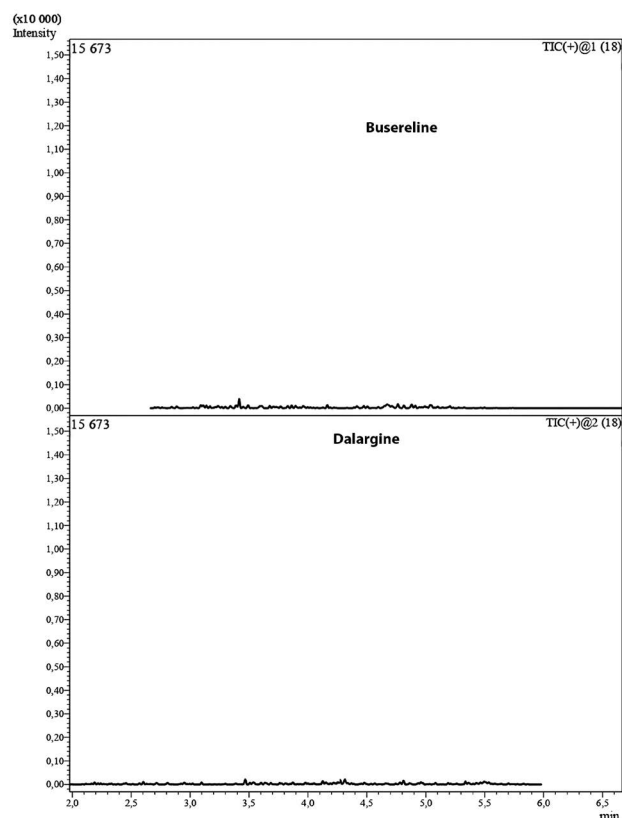


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови
Figure 2. Chromatogram of a blank plasma sample

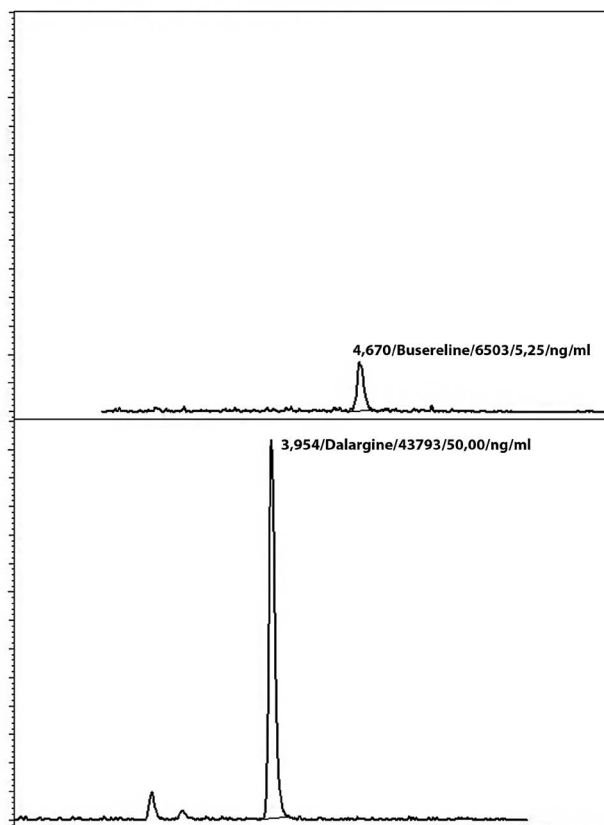


Рисунок 3. Хроматограмма модельного образца интактной плазмы крови, содержащего стандартный раствор бусерелина до концентрации 5,0 нг/мл и рабочий стандартный раствор ВС до концентрации 50 нг/мл

Figure 3. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of a standard solution to concentration of busereline 5,0 ng/ml and standard solution to concentration of IS 50 ng/ml

3) образцов интактной плазмы крови не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующих бусерелину и ВС.

Линейность

Для определения калибровочной зависимости проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови с добавлением рабочих стандартных растворов бусерелина до концентраций 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл, 8 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл и рабочего стандартного раствора ВС до концентрации 50 нг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график (рисунки 4) в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонение концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от фактических значений представлены в таблице 3

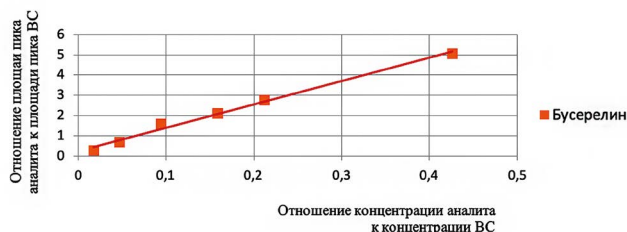


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика бусерелина к площади пика ВС от отношения концентрации бусерелина к концентрации ВС в плазме крови

Figure 4. The calibration curve dependence of the ratio area peak of busereline to the IS on the concentration ratio of busereline to the IS in plasma

Таблица 3. Отклонение концентраций бусерелина от фактических значений

Figure 3. Deviation of busereline concentrations from nominal values

Концентрация номинальная, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма, не более %
1,00	0,87	-13,0	20
2,50	2,38	-4,8	15
5,00	4,73	-5,4	15
8,00	7,94	-0,8	15
10,00	10,61	6,1	15
20,00	21,30	6,5	15

Эффект матрицы

Для определения влияния биологической матрицы на количественное определение бусерелина в плазме крови был рассчитан эффект матрицы (matrix effect, ME), нормализованный эффект матрицы (ME_{norm}) по ВС и степень извлечения (recovery, RE). Эффект матрицы и степень извлечения были оценены на уровнях 2,5 нг/мл и 20 нг/мл для бусерелина. Средние значения ME составили 76%, ME_{norm} – 98% и RE – 73% на уровне 2,5 нг/мл и ME – 73%, ME_{norm} – 96% и RE – 80% на уровне 20 нг/мл. Таким образом, степень извлечения на нижнем и верхнем уровне имеет незначительное отличие, тем самым показывая одинаковую степень извлечения на всех калибровочных уровнях. Рассчитанные значения коэффициента вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по ВС, соответствуют нормам руководств и не превышают 15%.

Правильность и прецизионность

Для оценки правильности и прецизионности был проведен анализ 4 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации бусерелина 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл. Образцы хроматографировали по 5 раз на каждом уровне концентрации анализата. Исследование проводили в течение 1-й последовательности

(внутри цикла) и 2-й последовательности (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), представленные в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Правильность и прецизионность методики (внутри цикла)

Table 4. Accuracy and precision of the method (inter-day)

введено (нг/мл)	найденно (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	E, %
1	0,896	0,051	5,646	-10,440
2,5	2,619	0,096	3,676	4,760
10	11,262	0,319	2,830	12,618
20	19,878	0,937	4,715	-0,610

Таблица 5. Правильность и прецизионность методики по бусерелину (между циклами)

Table 5. Accuracy and precision of the method (intra-day)

введено (нг/мл)	найденно (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	E, %
1	0,926	0,096	10,316	-7,420
2,5	2,514	0,167	6,639	0,572
10	10,604	0,755	7,118	6,040
20	19,557	1,058	5,408	-2,216

Полученные значения RSD и E соответствовали нормам руководств (не более 20% для нПКО и не более 15% для остальных точек).

На основании исследований линейности, правильности и прецизионности был определен нПКО. нПКО бусерелина составил 1,0 нг/мл (рисунок 5). Таким образом, выбранный нПКО можно считать действительным.

Стабильность

Стабильность анализируемого вещества и внутреннего стандарта была оценена в составе исходного и рабочего стандартных растворов, биологической матрицы при трехкратной заморозке-разморозке, краткосрочном и долгосрочном хранении на уровнях концентраций 2,5 нг/мл и 20 нг/мл. Площадь пиков при повторных анализах на двух приборах не изменялась более чем на 15%.

Перенос пробы

Отсутствие переноса пробы было доказано последовательным анализом образца с концентрацией анализата 20 нг/мл и образца холостой плазмы крови. На хроматограммах образца холостой плазмы не наблюдалось каких-либо пиков, соответствующих по временам удерживания бусерелину и ВС.

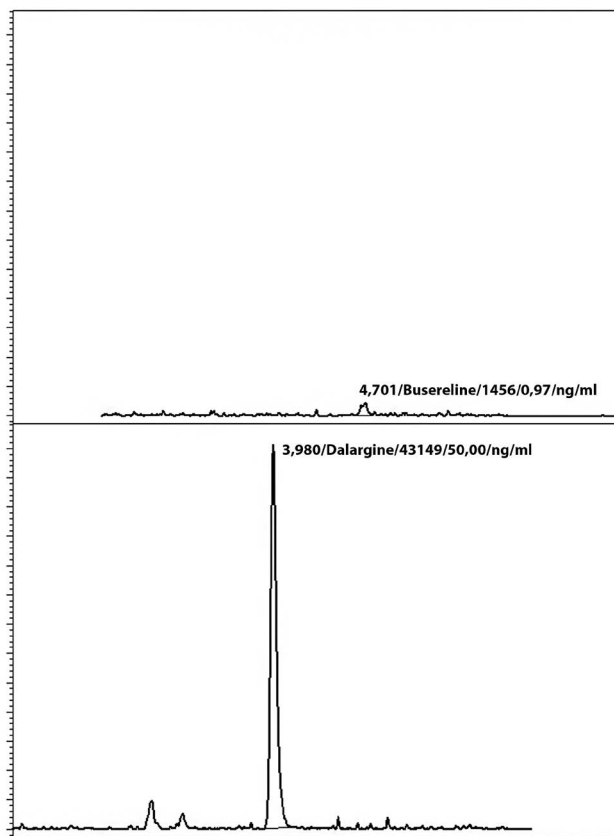


Рисунок 5. Хроматограмма модельного образца интактной плазмы крови, содержащего стандартный раствор бусерелина на уровне нПКО 1,0 нг/мл

Figure 5. Chromatogram of a blank plasma sample with the addition of standard solutions of IS and busereline at the level LLOQ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения бусерелина в плазме крови животных методом ВЭЖХ-МС/МС. Аналитический диапазон методики составил 1,0–20 нг/мл. Разработанная методика с уровнем нПКО 1,0 нг/мл может быть использована в рамках доклинических исследований с целью исследования фармакокинетики лекарственных средств, содержащих бусерелин.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Suszka-Świtek A., Ryszka F., Dolińska B., Dec R., Danch A., Filipczyk L., Wiaderkiewicz R. Pharmacokinetics and Bioavailability of the GnRH Analogs in the Form of Solution and Zn²⁺-Suspension After Single Subcutaneous Injection in Female Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2017; 42(2): 251–259.
2. Chrisp P., Goa L. K. Goserelin A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Clinical Use in Sex Hormone-Related Conditions. *Drugs Evaluation.* 1991; 41(2): 254–288.
3. Castro R. S., Sato H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International.* 2015; 74: 185–198.
4. Wilson A. C., Meethal V. M., Bowen R. L., Atwood C. S. Leuprolide acetate: drug of diverse clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2007; 16(11): 1–13.

5. Kogot J. M., Sarkes D. A., Val-Addo I., Pellegrino P. M., Stratis-Cullum D. N. Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene-binding peptide tag. *BioTechniques.* 2012; 52: 95–102.
6. Trudeau K., Vu K. D., Shareck F., Lacroix M. Capillary Electrophoresis Separation of Protein Composition of γ -Irradiated Food Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): 1–9.
7. Gartenmann K., Kochhar S. Short-Chain Peptide Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometer after Derivatization with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47(12): 5068–5071.
8. Jung F., Gee S. J., Harrison R. O., Goodrow M. H., Karu A. E., Braun A. L., Li Q. X., Hammock B. D. Use of Immunochemical Techniques for the Analysis of Pesticides. *Pestic Sci.* 1989; 26: 303–317.
9. Böttger R., Hoffmann R., Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0178943.
10. Kuhlreiber W. M., Washer S. L. L., Hsu E., Zhao M., Reinhold P., Burger D., Zheng H., Faustman D. L. Low levels of C-peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2015; 32(10): 1346–1353.
11. Kim M. K., Lee T. H., Suh J. H., Eom H. Y., Min J. W., Yeom H. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of goserelin in rabbit plasma. *Journal of Chromatography B.* 2010; 878: 2235–2242.
12. Zhang S., Han J., Leng G., Di X., Sha C., Zhang X., Li Y., Liu W. An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of goserelin and testosterone in rat plasma for pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *Journal of Chromatography B.* 2014; 965: 183–189.
13. Ismaiel O. A., Zhang T., Jenkins R., Karnes H. T. Determination of octreotide and assessment of matrix effects in human plasma using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879(22): 2081–2088.
14. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. M.: Grief and K. 2013; 280 p. (In Russ.).
15. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
16. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.



АНАЛИТИКА ЭКСПО

18-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

21–24.04.2020

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»



analitikaexpo.com

Забронируйте стенд

Организатор



Соорганизаторы



Ассоциация Аналитических Центров



Оригинальная статья/Research article

Влияние способа пробоподготовки образцов биологической природы на результаты определения тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектроскопии

Е. Н. Блохина¹, Н. В. Келус², В. С. Чучалин^{2*}

1 – ООО «Центр Тест Сервис», 126626, Россия, г. Москва, ул. Староалексеевская, д. 5

2 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

*Контактное лицо: Чучалин Владимир Сергеевич. E-mail: phtech@ssmu.ru

Статья получена: 24.05.2019. Статья принята к печати: 15.07.2019

Резюме

Введение. В статье показана значимость пробоподготовки для определения концентрации тяжелых металлов в биологических объектах методом атомно – эмиссионной спектроскопии микроволновой плазмой. Проведен сравнительный анализ результатов определения тяжелых металлов Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn разными способами пробоподготовки: с помощью твердофазной экстракции и микроволнового разложения.

Цель. Целью настоящей работы являлось сравнение методов и условий пробоподготовки биологических проб для определения содержания тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектрометрии микроволновой плазмы (МП-АЭС).

Материалы и методы. Объектом исследования для определения содержания тяжелых металлов являлась печень золотистых хомячков обоего пола массой 60–145 г вида Golden Syrian SPF категории, полученных из университета Федерального государственного научного учреждения «Федеральный исследовательский Центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук» (г. Новосибирск). Количественное определение тяжелых металлов в биологических пробах проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США).

Результаты и обсуждение. Сравнение содержания элементов в пробе, с использованием исследуемых пробоподготовок показало, что максимальное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается в случае применения метода микроволнового разложения. Наиболее полное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается при экстрагировании в течение 30 минут.

Заключение. Показано, что более высокие результаты регистрируются при использовании метода микроволнового разложения. Этот метод обеспечивает максимальное извлечение металлов, является наиболее точным, экспрессным и менее трудоемким, по сравнению с другими рассматриваемыми методами и подходит для определения большинства тяжелых металлов.

Ключевые слова: атомно-эмиссионный спектрометр, микроволновая подготовка, тяжелые металлы, твердофазная экстракция, биологические объекты.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. С. Чучалин спланировал эксперимент, Н. В. Келус и Е. Н. Блохина проводили анализ на оборудовании. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и оформлении статьи. Работа выполнена инициативно, без поддержки программ и грантов.

Для цитирования: Блохина Е. Н., Келус Н. В., Чучалин В. С. Влияние способа пробоподготовки образцов биологической природы на результаты определения тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 86–90.

Influence of the Method of Treatment of Samples of Biological Nature on the Results of Determination of Heavy Metals by Atomic Emission Spectroscopy

Elena N. Blokhina¹, Nadezhda V. Kelus², Vladimir S. Chuchalin^{2*}

1 – LLC «Center test service», 5, Staroalekseevskaya str., Moscow, 126626, Russia

2 – Siberian State Medical University, 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

*Corresponding author: Vladimir S. Chuchalin. E-mail: phtech@ssmu.ru

Received: 24.05.2019. Accepted: 15.07.2019

Abstract

Introduction. The article is devoted to the relevance of choosing sample preparation method for heavy metals concentration determination in biological sample by using atomic emission spectrometry. Much attention is given to compare 2 methods of sample preparation: solid-phase extraction and microwave decomposition. As the result of analysis of heavy metals Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn content using these sample preparation methods the following conclusions are drawn: maximum extraction of heavy metals is achieved by using microwave decomposition method.

Aim. The purpose of this work was to compare the methods and conditions for the sample preparation of biological samples for the determination of the content of heavy metals using atomic emission spectrometry.

Materials and methods. The object of the study to determine the content of heavy metals (Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn) was the liver of golden hamsters of both sexes weighing 60–145 g of the type Golden Syrian SPF category, obtained from the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk). Quantitative determination of heavy metals in biological samples was carried out on an Agilent 4100 atomic emission spectrometer with a microwave plasma (Agilent Technologies, USA).

Results and discussion. Comparison of the content of elements in the sample using the sample preparations under study showed that the maximum extraction of heavy metals from biological samples is achieved when using the method of microwave decomposition. The most complete extraction of heavy metals from biological samples is achieved by extraction within 30 minutes.

Conclusion. This method warrants the maximum metal extraction, is more accurate, rapid and less labor intensive compared to other methods considered, and is suitable for determining most heavy metals.

Keywords: atomic emission spectrometry, microwave decomposition, heavy metals, solid-phase extraction, biological sample.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Блохина Е. Н., Келус Н. В., Чучалин В. С., 2019

© Blokhina E. N., Kelus N. V., Chuchalin V. S., 2019

Contribution of the authors. Vladimir S. Chuchalin planned the experiment, Nadezhda V. Kelus and Elena N. Blokhina carried out an analysis on the equipment. All authors participated in data processing, discussion of the results and design of the article. The work was done initiatively, without the support of programs and grants.

For citation: Blokhina E. N., Kelus N. V., Chuchalin V. S. Influence of the method of treatment of samples of biological nature on the results of determination of heavy metals by atomic emission spectroscopy. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 86–90.

ВВЕДЕНИЕ

Пробоподготовка является важнейшим этапом процесса идентификации и количественного определения веществ в различных материалах и объектах. В химическом анализе применяются десятки методов пробоподготовки, учитывающих особенностями испытуемого объекта и природы определяемых веществ. Методы и условия процесса пробоподготовки призваны обеспечить полное удаление органических компонентов, постоянство определяемых элементов и перевод целевых веществ в форму, удобную для последующих операций анализа. Следует также отметить, что сложность и длительность способа пробоподготовки могут оказать решающее влияние на выбор и оценку эффективности того или иного метода аналитического контроля. Наиболее надежными и эффективными являются автоклавные методы пробоподготовки, предусматривающие использование систем герметично замкнутых реакционных объемов с микроволновым или резистивным нагревом. При этом наиболее часто используется автоклавная пробоподготовка в микроволновых сверхвысокочастотных (СВЧ) печах, такие системы широко используются в современных лабораториях при проведении рутинных анализов. Целью воздействия микроволнового излучения на этапе подготовки проб является получение требуемого компонента в форме, удобной для определения, чаще всего растворенной.

Известен альтернативный метод пробоподготовки, зарекомендовавший себя в других химических исследованиях, но мало изученный для биологических объектов – твердофазная экстракция (ТФЭ). Метод основан на экстрагировании веществ с их последующим отделением от биологического материала с использованием сорбционных колонок. Преимущества этого метода заключаются в получении достаточно очищенных от сопутствующих компонентов извлечений, простоте использования, сокращении времени при проведении серийных анализов.

Содержание тяжелых металлов (токсичных элементов) в различных продуктах и лекарственных средствах природного происхождения является важнейшим критерием, определяющим уровень их безопасности и степени антропогенного влияния на сырье. Анализ микроколичеств химических элементов в биологических объектах представляет собой доста-

точно сложную задачу. В настоящее время существуют две основные группы аналитических методов для определения тяжелых металлов: электрохимические и спектрометрические методы [1–3].

Достоинствами атомно-спектроскопических методов – атомно-эмиссионного и атомно-абсорбционного – являются универсальность и экспрессность, что особенно важно при анализе большого числа проб. Метод пламенной фотометрии, благодаря простоте выполнения, экспрессности и доступности оборудования, достаточно широко используется в практике клинических лабораторий при определении щелочных металлов в биологических жидкостях.

Трудности использования метода атомно-эмиссионной спектроскопии связаны с большим разнообразием проб, наличием в них примесей, мешающих определению. Сопутствующие вещества, количество которых варьирует в широком диапазоне, влияют на процессы испарения и возбуждения атомов в источнике света и существенным образом искажают результаты определения. Поэтому пробоподготовка биологических объектов является критически важным этапом в определении тяжелых металлов [4–8].

Целью настоящей работы являлось сравнение условий и режима пробоподготовки биологических проб для определения содержания тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектрометрии микроволновой плазмы (МП-АЭС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования для определения содержания тяжелых металлов (Fe, Zn, Rb, Cu, Al, Mn) являлась печень золотистых хомяков обоего пола массой 60–145 г вида Golden Syrian SPF категории, полученных из Федерального государственного научного учреждения «Федеральный исследовательский Центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук» (г. Новосибирск). Животных выводили из эксперимента путем асфиксии углекислым газом, подвергали вскрытию и извлекали орган. Образцы печени хранили при –80 °С в морозильной камере [9]. Количественное определение тяжелых металлов в биологических пробах проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США).

Подготовка биологических проб с помощью микроволновой пробоподготовки Speedware four SW-4. Описано множество методов пробоподготовки биологических проб для АЭС-анализа [10–12]. Мы использовали метод кислотного разложения в микроволновой печи, который пригоден для большинства органических соединений и характеризуется высокой эффективностью. Кислотное разложение проб проводилось в системе Speedware four SW-4 (Berghof, США) с использованием азотной и соляной кислот. Измерение холостых растворов показало, что содержание анализируемых металлов находится ниже предела обнаружения метода.

Биологические пробы массой 0,3 г помещали во фторопластовые автоклавы, добавляли 5 мл азотной кислоты (х.ч.) и 1 мл соляной кислоты (х.ч.), автоклавы закрывали и помещали в систему, где их подвергали микроволновому и термическому воздействию в режиме, приведенном в таблице 1.

Таблица 1. Режим микроволновой пробоподготовки объектов

Table 1. Mode of microwave sample preparation of objects

№ шага программы	Температура, °С	Давление	Время роста, мин	Время удерживания, мин	Мощность микроволновой печи, % от максимальной (1450 Вт)
1	180	40	10	5	60
2	200	40	1	25	60
3	50	0	1	10	60
4	50	0	1	5	40
5	50	0	1	5	40

В результате пробоподготовки получены прозрачные растворы без посторонних включений, пригодные для анализа методом МП-АЭС. Растворы переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки водой очищенной. Полученный раствор анализировали на содержание тяжелых металлов на МП-АЭС.

Пробоподготовка биологических проб с помощью твердофазной экстракции. Пробу массой 0,3 г помещали в стакан, добавляли 5 мл воды очищенной и гомогенизировали с помощью диспергатора IKA basic ULTRA-TURRAX. Полученную взвесь переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 0,1 н азотной кислотой. Далее суспензию подвергали центрифугированию в разные сроки: сразу после гомогенизации и разведения, через каждые 30 минут после приготовления разведения. Для анализа отбирали 6 мл надосадочного раствора. Для активирования сорбента перед началом работы на ТФЭ через картридж (HF Bond Elut C18) пропускали 5 мл метанола, затем сорбент уравнивали 5 мл воды. С помощью одноканально-го дозатора в картридж вносили количество пробы,

составляющей 3/4 вместимости патрона. В процессе элюирования на сорбенте удерживаются органические примеси, а элюент собирается в емкость для слива. Полученный элюент анализировали на содержание тяжелых металлов на МП-АЭС.

Пробоподготовка биологических проб с помощью экстрагирования без использования сорбента. Пять проб одного образца массой 0,3 г помещали в стаканы, добавляли 5 мл воды первой степени чистоты и гомогенизировали с помощью диспергатора IKA basic ULTRA-TURRAX. Полученный раствор переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 0,1 н азотной кислотой. Первую пробу центрифугировали сразу, последующие пробы центрифугировали, через каждые 30 минут. Далее отбирали надосадочную жидкость и анализировали на МП-АЭС.

Определение содержания тяжелых металлов методом МП-АЭС. Концентрацию тяжелых металлов (Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn) определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США) при длине волны Fe (259,940 нм), Zn (213,857 нм), Rb (780,027 нм), Cu (324,754 нм), Al (396,152 нм), Mn (403,076 нм). Для построения градуировочного графика готовили 3 раствора стандартных концентраций. На аналитических весах в мерных колбах взвешивали ГСО определяемых элементов или смесь элементов (Bottle ICP-OES Wavescal conc), доводили до метки водой. Далее производили расчет концентрации ионов определяемых элементов в градуировочных растворах по формуле:

$$X_{\text{гр}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot m_{\text{ст}}}{V},$$

где $X_{\text{гр}}$ – концентрация ионов в градуировочном растворе, мг/л; $C_{\text{ст}}$ – концентрация соответствующего элемента в ГСО или многоэлементный калибровочный стандарт, мг/л; $m_{\text{ст}}$ – масса взвешенного стандарта, мг; V – объем колбы, мл.

Анализ градуировочных образцов и построение градуировочного графика осуществляли в ходе испытания аналитической серии. Содержание определяемых элементов в растворах после пробоподготовки проводили атомно-эмиссионным методом на спектрометре Agilent 4100 при определенных условиях (таблица 2).

В соответствии с руководством по эксплуатации спектрометра Agilent 4100 осуществляли подготовку прибора, выбор элементов, основных линий, задавали концентрации градуировочных растворов, навески проб, объемы проб, разведение. Число репликаций (параллельных определений для каждого раствора) составляло 3. Предел обнаружения элементов в анализируемом растворе для атомно-эмиссионного спектрометра Agilent 4100 составлял для Fe – 0,1 мг/кг; Zn – 0,5 мг/кг; Rb – 0, 5 мг/кг; Mn – 0,1 мг/кг; Cu – 0,1 мг/кг; Al – 0,1 мг/кг.

Таблица 2. Условия проведения атомно-эмиссионного анализа с микроволновой плазмой

Table 2. Conditions for the atomic emission analysis with microwave plasma

Параметр прибора	Настройка
Распылитель	Стеклянный концентрический
Камера распылителя	Однопроходная стеклянная циклоническая
Трубки для образцов	Оранжевые/зеленые
Трубки для отходов	Голубые/голубые
Время считывания	15 с
Давление в распылителе	160–220 кПа
Количество повторов	3
Время стабилизации	15 с
Коррекция фона	Автоматически

Идентификацию элементов проводили по наличию пиков на заданной длине волны, соответствующих определяемым элементам. Массовая доля определяемого элемента в образце для каждой навески рассчитывалась автоматически в программе MP Expert (как среднее арифметическое трех параллельных определений).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение содержания элементов в пробе, с использованием исследуемых пробоподготовок показало, что максимальное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается в случае применения метода микроволнового разложения (рисунок 1). Этот метод оказался наименее трудоемким и экспрессным (среднее время разложения пробы и перевода в раствор занимает 2 часа). Оптимальные условия разложения биологических проб в системе микроволновой пробоподготовки Speedware four SW-4 (Berghof, США) подбирали экспериментально (таблица 1). В результате пробоподготовки были получены прозрачные растворы без посторонних включений, пригодные для анализа методом МП-АЭС.

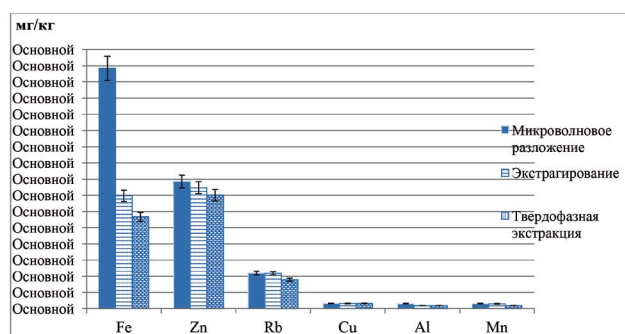


Рисунок 1. Определяемое содержание металлов в объекте исследования при различных способах пробоподготовки, ($M \pm m$, $n=6$)

Figure 1. The dependence of the metal content in the object of study on the method of sample preparation, ($M \pm m$, $n=6$)

При использовании методов твердофазной экстракции и экстракции степень извлечения ряда металлов оказалась ниже, чем при микроволновом разложении: в фильтрате, полученном без ультразвуковой обработки, содержалось существенно меньшее количество железа, алюминия и марганца, что свидетельствует об их частичном переходе в раствор (рисунок 1). Помимо неполной экстракции потеря отдельных элементов (особенно для алюминия и марганца) может быть связана с их задержкой на картридже, это видно при сравнении результатов определения концентрации тяжелых металлов в пробах после твердофазной экстракции и микроволнового разложения (рисунки 1 и 2). Так же следует отметить, что метод твердофазной экстракции достаточно трудоемок и требует более длительной пробоподготовки (измельчение пробы, растворение в кислоте, гомогенизация, фильтрование). Единственным элементом, полнота определения которого не связана с методом пробоподготовки, оказалась медь (рисунок 1).

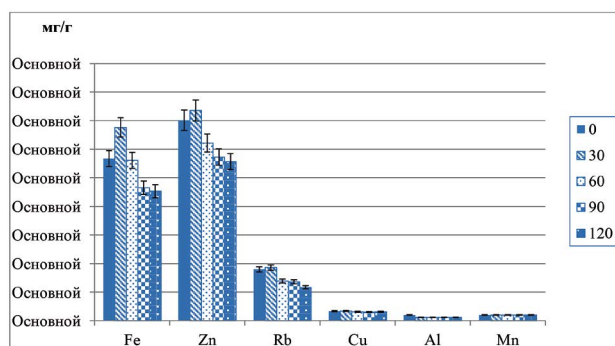


Рисунок 2. Влияние времени настаивания на содержания металлов в пробе при твердо фазной экстракции ($M \pm m$, $n=6$)

Figure 2. The effect of infusion time on the metal content in the sample during solid-phase extraction ($M \pm m$, $n=6$)

Наиболее полное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается при экстрагировании в течение 30 минут (рисунок 2). Более продолжительное настаивание суспензии биоматериала в экстрагенте не сопровождалось ростом измеряемых показателей, как и при твердофазной экстракции (рисунок 2) так и при обычной экстракции (рисунок 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов измерения содержания тяжелых металлов в биологическом материале с использованием различных способов пробоподготовки свидетельствует, что наибольшее количество элементов более точно определяется при использовании метода микроволнового разложения. Этот метод обеспечивает максимальное извлечение металлов, является наиболее точным, экспрессным и менее трудоемким

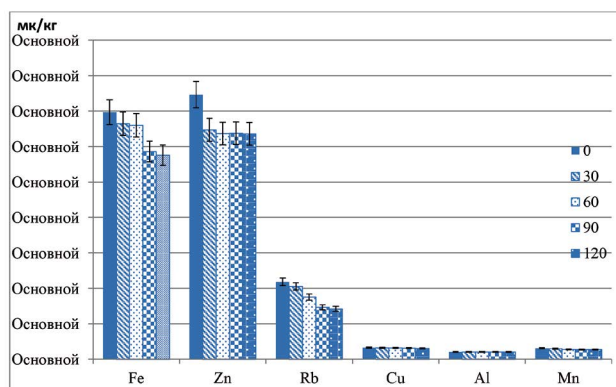


Рисунок 3. Влияние времени настаивания на содержания металлов в пробе при экстракции ($M \pm m$, $n=6$)

Figure 3. The effect of infusion time on the metal content in the sample during extraction ($M \pm m$, $n=6$)

по сравнению с другими рассмотренными методами. Метод микроволнового разложения при подготовке проб подходит для определения большинства тяжелых металлов.

ЛИТЕРАТУРА

- Штин С. Учебно-методический комплекс дисциплины «Особенности пробоотбора и пробоподготовки объектов окружающей среды». Екатеринбург: Урал. гос. ун-т им. А. М. Горького. 2008: 47.
- Бок Р. Методы разложения в аналитической химии. М. 1984: 432.
- Пупышев А. Пламенный и электротермический атомно-абсорбционный анализ. Екатеринбург: Урал. гос. техн. ун-т. 2008: 101.
- Субботина Н. С., Дмитриук С. Е., Бабешина Л. Г., Келус Н. В., Никифоров Л. А., Носкова Г. Н., Тартынова М. И. Исследование исходного сырья и экстрактов на содержание тяжелых металлов. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2010; 8 (3): 92–97.
- Кингстон Г. М., Джесси Л. В. Пробоподготовка в микроволновых печах. М. 1991: 326.
- Орлова В. А. Автоклавная пробоподготовка в химическом анализе. Дис. ... докт. хим. наук. М. 2001: 313.
- Kelus N., Novikova Y., Chuchalin V., Blokhina E., Novikov D. Investigation of metal ions sorption of brown peat moss powder. *AIP Conference Proceedings*. 2017; 1899(1): 050002. <https://doi.org/10.1063/1.5009865>.
- Келус Н. В. Технология сорбента на основе сфагнового мха. Дис. ... канд. фарм. наук. – СПб. 2013: 147.
- Lezhava S. P., Pershina A. G., Kokova D. A. Opisthorchis felinus Infection and Harmful Metals Bio-Concentration. *A Pilot Study in Hamster Model*. 2015; 1085: 370–376.
- Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M. Comparative Analysis of Sample Preparation Methods. *Anal. Chem.* 2012: 341–348.
- Segstro E., Goltz D., Hall T. Eaching Sample Preparation in the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* 2000: 1486.
- Steehler J. K. Sample preparation techniques in analytical chemistry. *J. Chem. Educ.* 2004: 162–199.

REFERENCES

- Shtin S. Educational and methodical complex of discipline «Features of sampling and sample preparation of environmental objects»: Ekaterinburg: Ural. state un-t them. A. M. Gorky. 2008: 47 (In Russ.).
- Bock R. Methods of decomposition in analytical chemistry. M. 1984: 432 (In Russ.).
- Pupyshev A. Flame and electrothermal atomic absorption analysis. Ekaterinburg: Ural. state tech. Univ., 2008: 101 (In Russ.).

- Subbotina N. S., Dmitruk S. E., Babeshina L. G., Kelus N. V., Nikiforov L. A., Noslava G. N., Tartynova M. I. The study of raw materials and extracts on the content of heavy metals. *Bulletin of Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. 2010. 8(3): 92–97 (In Russ.).
- Kingston G. M., Jesse L. V. Sample preparation in microwave ovens. M. 1991: 326 (In Russ.).
- Orlova V. A. Autoclave sample preparation in chemical analysis. Dis. ... Dr. chemical sciences. M. 2001: 313 (In Russ.).
- Kelus N., Novikova Y., Chuchalin V., Blokhina E., Novikov D. Investigation of metal ions sorption of brown peat moss powder. *AIP Conference Proceedings*. 2017; 1899(1): 050002. <https://doi.org/10.1063/1.5009865>.
- Kelus N. V. Sorbent moss based sorbent technology. Dis. ... Cand. farm sciences. – SPb. 2013: 147 (In Russ.).
- Lezhava S. P., Pershina A. G., Kokova D. A. Opisthorchis felinus Infection and Harmful Metals Bio-Concentration. *A Pilot Study in Hamster Model*. 2015; 1085: 370–376.
- Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M. Comparative Analysis of Sample Preparation Methods. *Anal. Chem.* 2012: 341–348.
- Segstro E., Goltz D., Hall T. Eaching Sample Preparation in the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* 2000: 1486.
- Steehler J. K. Sample preparation techniques in analytical chemistry. *J. Chem. Educ.* 2004: 162–199.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-91-100>
УДК 615.12; 615.038



Оригинальная статья/Research article

Сравнительное исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба (RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального биотехнологического препарата Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных группах при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев

М. А. Колганова^{1*}, Н. С. Багаева¹, Ю. В. Медведев^{1,2}, И. Е. Шохин¹, А. В. Демчинская³, Т. Н. Палкина³, Д. А. Салазанов³, Г. Е. Коноплева³, М. С. Шереметьева³, Ш. З. Арчуадзе³, Я. В. Лавровский⁴, А. Ю. Савченко⁵, М. Ю. Самсонов³

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20 стр. 3

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

3 – АО «Р-Фарм», 119421, Россия, Ленинский проспект, д. 111В

4 – R-Pharm Overseas Inc., La Jolla, Калифорния, США

5 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Россия, Московская область, Красногорский район, пос. Светлые Горы, владение 1

*Контактное лицо: Колганова М. А. E-mail: m.kolganova@cpha.ru

Статья получена: 11.07.2019. Статья принята к печати: 30.08.2019

Резюме

Введение. Бевацизумаб – биотехнологический лекарственный препарат, представляющий собой моноклональные IgG1 антитела, которые связываются и ингибируют активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Бевацизумаб входит в состав таргетной терапии разных солидных опухолей и рекомендован к применению как в качестве монотерапии, так и в составе комплексной химиотерапии. Было проведено клиническое исследование I фазы для оценки фармакокинетики и иммуногенности препаратов бевацизумаба. В исследование были включены 80 здоровых мужчин-добровольцев.

Цель. Сравнительная оценка фармакокинетики и иммуногенности (безопасности) оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам.

Материалы и методы. Количественное определение бевацизумаба и полуколичественное определение антител к бевацизумабу в сыворотке крови здоровых добровольцев проводилось методом иммуноферментного анализа с фотометрическим детектированием. Для выполнения аналитической части исследования были валидированы две независимые методики.

Результаты и обсуждение. Методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность и специфичность, калибровочная кривая, чувствительность, точность и прецизионность, минимально необходимое разведение, возможность разведения образцов и стабильность. Методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови была валидирована по следующим валидационным параметрам: предел исключения (cut-point) с расчетом фактора нормализации, селективность, чувствительность, прецизионность, толерантность к лекарственному препарату, тест на разведение, эффект матрицы (при выраженном гемолизе) и стабильность. Валидированные методики были применены на практике для проведения аналитической части исследования фармакокинетики и иммуногенности препаратов бевацизумаба.

Заключение. По результатам фармакокинетического анализа тестовый и референтный препарат были признаны биоэквивалентными. Анализ иммуногенности не выявил антител к бевацизумабу ни у одного из добровольцев.

Ключевые слова: бевацизумаб, иммуногенность, фармакокинетика, препараты-биоаналоги, биоэквивалентность, иммуноферментный анализ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. В. Демчинская, Т. Н. Палкина, Д. А. Салазанов, Г. Е. Коноплева, М. С. Шереметьева, Ш. З. Арчуадзе, Я. В. Лавровский, М. Ю. Самсонов организовывали клинический этап исследования, А. Ю. Савченко, Ю. В. Медведев, М. А. Колганова, И. Е. Шохин организовывали и выполняли аналитический этап исследования, Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов исследования.

Для цитирования: Колганова М. А., Багаева Н. С., Медведев Ю. В., Шохин И. Е., Демчинская А. В., Палкина Т. Н., Салазанов Д. А., Коноплева Г. Е., Шереметьева М. С., Арчуадзе Ш. З., Лавровский Я. В., Савченко А. Ю., Самсонов М. Ю. Сравнительное исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата-биоаналога бевацизумаба (RPH-001, АО «Р-Фарм», Россия) и оригинального биотехнологического препарата Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) в параллельных группах при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(3): 91–100.

A Comparative Parallel Study of Pharmacokinetics and Immunogenicity Following Single Intravenous Administration of Bevacizumab Biosimilar RPH-001 (Manufactured by R-Pharm Group, Russia) and Avastin® (Manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in Healthy Male Volunteers

Maria A. Kolganova^{1*}, Natalia S. Bagaeva¹, Yuri V. Medvedev^{1,2}, Igor E. Shohin¹, Anna V. Demchinskaya³, Tatyana N. Palkina³, Dmitry A. Salazanov³, Galina E. Konopleva³, Marina S. Sheremeteva³, Shorena Z. Archuadze³, Yan V. Lavrovsky⁴, Alla Yu. Savchenko⁵, Mikhail Yu. Samsonov³

© Колганова М. А., Багаева Н. С., Медведев Ю. В., Шохин И. Е., Демчинская А. В., Палкина Т. Н., Салазанов Д. А., Коноплева Г. Е., Шереметьева М. С., Арчуадзе Ш. З., Лавровский Я. В., Савченко А. Ю., Самсонов М. Ю., 2019

© Kolganova M. A., Bagaeva N. S., Medvedev Yu. V., Shohin I. E., Demchinskaya A. V., Palkina T. N., Salazanov D. A., Konopleva G. E., Sheremeteva M. S., Archuadze Sh. Z., Lavrovsky Y. V., Savchenko A. Yu., Samsonov M. Yu., 2019

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
3 – JSC «R-Pharm», 111B, Leninsky avenue, 119421, Russia
4 – R-Pharm Overseas Inc, La Jolla, California, USA
5 – Scientific Center for Biomedical Sciences, vl. 1, pos. Svetlye Gory, Krasnogorsk r-n, Moscow reg., 143442, Russia
*Corresponding author: M. A. Kolganova. E-mail: m.kolganova@cpha.ru
Received: 11.07.2019. Accepted: 30.08.2019

Abstract

Introduction. Bevacizumab is a monoclonal IgG1 antibody that binds to and inhibits the biologic activity of human vascular endothelial growth factor (VEGF). Bevacizumab is used as a targeted mono- or combination therapy for different solid tumors. Phase I clinical trial was performed to assess pharmacokinetics (PK) and immunogenicity of bevacizumab drugs. For this study 80 healthy male volunteers were recruited and randomized to either Avastin or RPH-001 group.

Aim. To assess and compare pharmacokinetics and immunogenicity (safety) following single intravenous administration of Avastin® (manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) and bevacizumab biosimilar RPH-001 (manufactured by R-Pharm Group, Russia).

Materials and methods. Bevacizumab quantitation and quasi-quantitative anti-bevacizumab antibodies detection in human blood serum were carried out using photometric ELISA. Two different methods were successfully validated.

Results and discussion. Bevacizumab quantitation method was validated for selectivity and specificity, calibration curve, sensitivity, accuracy and precision, minimal required dilution, dilution linearity and stability. The anti-bevacizumab antibodies detection method was validated for cut-point (with normalization factor calculation), selectivity, sensitivity, precision, drug tolerance, dilution linearity, matrix effect (in case of serum hemolysis), and stability. The validated methods were successfully applied to pharmacokinetic and immunogenicity assessment of bevacizumab drugs.

Conclusion. The results of the PK-study showed that test and reference bevacizumab drugs were equivalent. Immunogenicity study did not show any evidence of anti-bevacizumab antibodies in blood serum samples.

Keywords: bevacizumab, immunogenicity, pharmacokinetics, biosimilars, bioequivalence, enzyme-linked immunosorbent assay.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anna V. Demchinskaya, Dmitry A. Salazanov, Galina E. Konopleva, Marina S. Sheremeteva, Shorena Z. Archuadze, Yan V. Lavrovskiy, Mikhail Y. Samsonov have organized a clinical part of the study; Alla Y. Savchenko, Maria A. Kolganova, Yuri V. Medvedev, Igor E. Shohin have organized and performed analytical part of the study, Natalia S. Bagaeva has conducted a statistical data processing. All authors have participated in study results discussion.

For citation: Kolganova M. A., Bagaeva N. S., Medvedev Yu. V., Shohin I. E., Demchinskaya A. V., Palkina T. N., Salazanov D. A., Konopleva G. E., Sheremeteva M. S., Archuadze Sh. Z., Lavrovskiy Y. V., Savchenko A. Yu., Samsonov M. Yu. A comparative parallel study of pharmacokinetics and immunogenicity following single intravenous administration of bevacizumab biosimilar RPH-001 (manufactured by R-Pharm Group, Russia) and Avastin® (manufactured by F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland) in healthy male volunteers. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 91–100.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно официальной статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) онкологические заболевания – вторая по распространенности причина смертности в мире. В 2018 году от различных онкологических заболеваний умерли 9,6 млн человек по всему миру. Самые распространённые виды рака по оценкам ВОЗ – это рак лёгких и рак молочной железы (примерно по 2,09 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год), колоректальный рак (примерно 1,8 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год) и рак предстательной железы (1,28 млн зарегистрированных случаев смерти за 2018 год) [1]. При такой высокой распространённости и смертности открытым остается вопрос ранней диагностики онкологических заболеваний и дальнейшего лечения после постановки диагноза. На современном этапе помимо консервативных стратегий лечения рака (хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия, гормональная терапия, иммунотерапия) все чаще используют инновационные методы, такие как, например, таргетная терапия. В состав таргетной терапии входят биологические лекарственные препараты моноклональных антител, которые позволяют селективно воздействовать на раковые клетки, не вызывая при этом повреждение собственных здоровых клеток организма [2, 3].

Бевацизумаб – биотехнологический лекарственный препарат, представляющий собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные IgG1 антитела, которые связываются и ингибируют активность фактора роста эндотелия сосудов (human vascular endothelial growth factor, VEGF). Связывание бевацизумаба с VEGF препятствует взаимодействию последнего с рецепторами на поверхности клеток (Flt-1 и KDR), вследствие чего происходит ингибирование пролиферации клеток эндотелия и нарушается процесс ангиогенеза. В структуре бевацизумаба выделяют человеческие каркасные участки иммуноглобулина с определяющими комплементарность участками гиперхимерных мышиных антител, которые связываются с VEGF. Получение бевацизумаба проводят в системе экспрессии, представленной клетками яичников китайского хомячка, в присутствии гентамицина. Молекулярная масса бевацизумаба составляет примерно 149 кД [4].

Целью работы являлась сравнительная оценка фармакокинетики и иммуногенности (безопасности) оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование I фазы по протоколу: «Двойное слепое рандомизированное сравнительное, в параллельных группах, клиническое исследование фармакокинетики и безопасности препаратов RPH-001 (АО «Р-Фарм», Россия) и Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев» (РКИ № 250, 29.05.2018) [5] проводилось в одном клиническом центре на территории Российской Федерации. В исследование были включены 80 здоровых добровольцев мужского пола. Объектами исследования были:

- *тестовый препарат*: RPH-001 (МНН: бевацизумаб), производитель АО «Р-Фарм», Россия; однократное внутривенное введение в дозе 5 мг/кг;
- *референтный препарат*: Авастин® (МНН: бевацизумаб), производитель Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария; однократное внутривенное введение в дозе 5 мг/кг.

Для достижения поставленных целей на аналитическом этапе исследования были валидированы две методики: для фармакокинетического определения бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев (ФК-методика) и для полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев (Anti-drug antibody, ADA-методика).

Оборудование

При валидации обеих методик для определения оптической плотности образцов в лунках ИФА-планшета использовали планшетный иммуноферментный анализатор STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США). Для промывания ИФА-планшетов использовали промыватель планшетов автоматический двухканальный (ПП2-428, Иммедтех, Россия). Для инкубации внесенных образцов в лунках планшета использовали термошейкер для планшетов (Biosan, EC). Кроме того, в процессе пробоподготовки образцов и внесения образцов в лунки планшета использовали вспомогательное оборудование: одноканальные и многоканальные дозаторы различного объема (Thermo Scientific, Россия), вортекс-шейкер (Heidolph Reax Top, Германия), высокоскоростную мини-центрифугу Microspin 12 (Biosan, EC), систему водоподготовки «АКВАЛАБ» УВОИ-«МФ»-1812 (Медиана-фильтр, Россия), холодильник фармацевтический XF-400-2 (АО «Производственное объединение «Завод имени Серго») и морозильник микропроцессорный для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов MM-180/20/35 «Позис» (Позис, Россия).

Реактивы

Во время валидации методики количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев применялись следующие реактивы: вода очищенная, натрия гидрофосфат (PanReas AppliChem,

Германия, класс «pure, pharma grade»), калия дигидрофосфат (Компонент-Реактив, Россия, класс «ч.д.а.»), бычий сывороточный альбумин (Диаэм, Россия), твин-20 (PanReas AppliChem, Германия, класс «pure, pharma grade»); натрия хлорид (Компонент-Реактив, Россия, класс «ч.»), и в том числе реактивы и материалы, входящие в состав иммуноферментной тест-системы для количественного определения бевацизумаба в биологических жидкостях (ООО «НПЦ Пробиотек», Россия): планшет 96-луночный, калибровочная проба (200 нг/мл бевацизумаба), фосфатно-солевой буферный раствор (20х), конъюгат антител IgG человека с пероксидазой хрена, раствор субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМБ), стоп-реагент.

Во время валидации методики полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев применялись следующие реактивы: вода очищенная, и в том числе реактивы и материалы, входящие в состав иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) – ADA, производства Somru® BioScience, Канада (Cat#: SB-06-041, Lot#: 5-08-20C): Coated Microtiter Plate, Positive Control Concentrate, Control Diluent, Biotinylated reagent (3,200X), Detection Reagent (20,000X), Wash Buffer (20X), Assay Buffer, TMB Substrate, TMB Stop Solution.

Методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови

Согласно инструкции к набору определение концентрации бевацизумаба в сыворотке крови добровольцев, а также при валидации методики, проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующей схеме:

- ✓ Разбавляли все образцы в 1000 раз с помощью раствора Разбавителя, состоящего из фосфатного буферного раствора, бычьего сывороточного альбумина и твина-20. Разбавленные образцы готовили непосредственно перед анализом.
- ✓ В лунки планшета вносили 100 мкл соответствующих образцов (калибровочных образцов, образцов контроля качества, образцов интактной сыворотки крови, исследуемых образцов).
- ✓ Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 минут на шейкере при температуре 25 °C с частотой встряхивания 170 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 250 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки и выдерживая в течение 2 минут. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 30 мин на шейкере при температуре 25 °C с частотой встряхивания 170 об/мин.

- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 250 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки и выдерживая в течение 2 минут. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл раствора ТМБ. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 15 мин при температуре 25 °С в защищенном от света месте.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли и во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и ТМБ, вносили по 100 мкл стоп-реагента. Планшет заклеивали пленкой и перемешивали в течение 1 минуты на шейкере при температуре 25 °С и с частотой встряхивания 170 об/мин.
- ✓ По окончании перемешивания пленку удаляли и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови

Согласно инструкции к набору определение антител к бевацизумабу в сыворотке крови добровольцев (этап скрининга образцов), а также при валидации методики, проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующей схеме:

- ✓ Разбавляли все контрольные и исследуемые образцы в 10 раз с помощью раствора Assay buffer.
- ✓ Вносили в соответствующие лунки по 100 мкл образцов. Внесение проводили в течение времени не более 10 минут.
- ✓ Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 минут на шейкере при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл приготовленного раствора Biotinylated Reagent. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл приготовленного раствора Detection Reagent. Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре с частотой встряхивания 300 об/мин.

- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли, промывали лунки 3 раза промывочным раствором, внося по 300 мкл в каждую лунку в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удаляли, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
- ✓ Во все лунки вносили по 100 мкл субстрата (TMB substrate). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 10–15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- ✓ После окончания инкубации пленку удаляли и во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстрат, вносили по 100 мкл стоп-реагента (TMB stop solution) и слегка перемешивали.
- ✓ Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм и референсной длине волны 630 нм.

Статистический анализ полученных данных

На основании полученных результатов измерения концентрации бевацизумаба в плазме крови добровольцев с помощью программы R Statistics 3.4.3 (Package «bear» 2.8.3-2) были определены и вычислены следующие фармакокинетические параметры бевацизумаба:

$C_{\max}$ – максимальная концентрация в плазме, достигаемая на основе экспериментальных данных, полученных непосредственно по кривой соотношения концентрации в плазме и времени. Данные по $C_{\max}$ представлены по виду принимаемого препарата (RPH-001 и Авастин®).

$t_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации ($C_{\max}$).

AUC_{0-t} – суммарная площадь под кривой концентрации препарата от момента его попадания в организм до t -часа. Площадь рассчитывается с помощью метода трапеции (linear-up/log-down) по формуле (фаза элиминации):

$$AUC_{0-t} = \sum_{p=1}^t \frac{(C_{p-1} - C_p)}{\ln(C_{p-1}) - \ln(C_p)} (t_p - t_{p-1}),$$

где C_p – концентрация вещества в крови в момент времени t_p ; $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная от нуля до бесконечности.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{k_{el}},$$

где $C_{\max}/AUC_{0-t} - C_{\max}'$ скорректированная на степень всасывания; $rAUC$ – экстраполированная часть площади, рассчитанная по формуле:

$$rAUC = \frac{(AUC_{0-\infty} - AUC_{0-t})}{AUC_{0-\infty}},$$

где λ_z – константа скорости элиминации, оцениваемая по угловому коэффициенту линии регрессии, рассчитанного по методу наименьших квадратов, натураль-

ной логарифмической активности по отношению ко времени получения последних значений активности (не менее трех) выше нижнего предела количественного определения; V_z – кажущийся объем распределения; $T_{1/2}$ – период полувыведения определяли по формуле:

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{el}}.$$

Для каждого из вышеперечисленных показателей вычислены следующие значения описательной статистики: арифметическое среднее, геометрическое среднее, медиана, стандартное отклонение, коэффициент вариации, минимум, максимум.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови проводилась на основании Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [6] и «Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», 2016 [7] по следующим валидационным параметрам:

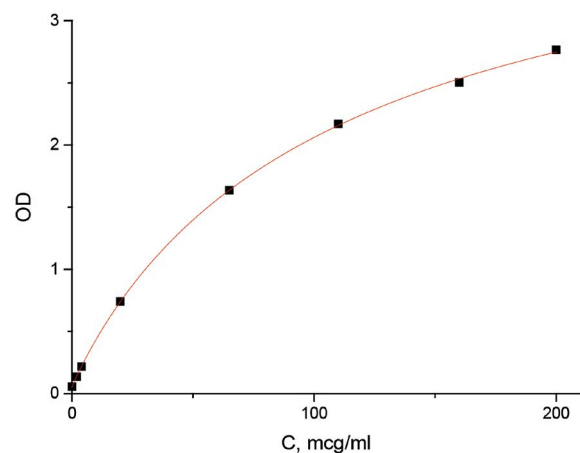
1. **Селективность и специфичность.** Селективность оценивалась с использованием 10 образцов интактной сыворотки крови и образцов сыворотки с добавлением бевацизумаба до уровня НПКО (2 мкг/мл), каждый из которых анализировали в трех повторах. Для оценки селективности методики рассчитывались значения относительной погрешности для каждого из образцов. Полученные значения соответствовали требованиям нормативной документации (относительная погрешность не менее 80% образцов с содержанием бевацизумаба на уровне НПКО составила не более $\pm 25\%$). Специфичность методики обеспечивалась использованием в ИФА-наборе антител с высокой специфичностью к бевацизумабу, а также специфических блокирующих реагентов, исключающих возможность получения ложноположительных результатов в сыворотке крови.
2. **Калибровочная кривая и чувствительность.** Построение калибровочных кривых осуществляли в ПО «Origin Pro 8.0» на основании данных, полученных при анализе 1 образца интактной сыворотки крови (0 мкг/мл бевацизумаба) и 7 калибровочных образцов с ненулевой концентрацией, содержащих известные количества бевацизумаба – 2, 4, 20, 65, 110, 160 и 200 мкг/мл. Валидированный аналитический диапазон методики составил 2–200 мкг/мл. Анализ проводили для 6 независимых повторностей. Для каждого из калибровочных образцов рассчитывали отклонение от номинального значения концентрации (относительная погрешность, E, %). Относительная погрешность соответствовала нормам нормативной документации и составила не более 14,5%

для нижнего диапазона линейности, не более 2,02% для верхнего диапазона и не более 5,75% для остальных точек. Чувствительность методики составила 2 мкг/мл (НПКО). Нижний предел количественного определения был выбран на основании данных точности и прецизионности методики. Значения концентраций стандартного образца на уровне НПКО были дискретными и воспроизводимыми со значениями прецизионности (RSD, %) и точности (E, %), не превышающими $\pm 25\%$. Калибровочная зависимость отношения оптической плотности образцов от концентрации бевацизумаба описывалась уравнением вида:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}, \quad (1)$$

где $A1$, $A2$, x_0 , p – параметры уравнения; y – оптическая плотность образца; x – концентрация бевацизумаба в образце.

Пример одного из 6 полученных калибровочных графиков приведен на рисунке 1.



A1	A2	x_0	p	R ²	Date	Val#
0,05054	4,29916	111,9262	0,95327	0,99972	10.10.2018	1

Рисунок 1. Калибровочный график № 1 зависимости отношения оптической плотности от концентрации бевацизумаба в калибровочных образцах

Figure 1. Calibration curve № 1 Optic density (OD) versus bevacizumab concentration of the calibration standards

3. **Точность и прецизионность.** Оценивали с использованием пяти образцов контроля качества, с известными концентрациями бевацизумаба (2; 5,5; 100; 150 и 200 мкг/мл). Анализ проводили для 6 последовательностей по 3 повтора для каждого уровня концентраций. Исследование проводили в течение 1-го цикла (точность и прецизионность внутри цикла) и 2–6 циклов (точность и прецизионность между циклов). Для полученных значений концентраций

были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %), относительной погрешности (E, %) и общей ошибки, приведенные в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Точность и прецизионность методики внутри цикла

Table 1. Accuracy and precision intra-day

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл) посл. 1	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=3)	RSD, % (n=3)	ε, %	Общая ошибка, %
2,00	1,92	1,90	1,33	-5,17	6,49
	1,87				
	1,90				
5,50	5,02	5,23	3,47	-4,97	8,44
	5,30				
	5,36				
100,00	96,45	95,87	0,98	-4,13	5,11
	96,38				
	94,79				
150,00	135,31	139,14	2,59	-7,24	9,83
	139,64				
	142,46				
200,00	182,08	179,01	1,51	-10,50	12,00
	176,99				
	177,96				

Таблица 2. Точность и прецизионность методики между циклами

Table 2. Accuracy and precision inter-day

№ цикла	концентрация образцов контроля качества				
	2,00	5,50	100,00	150,00	200,00
1	1,92	5,02	96,45	135,31	182,08
	1,87	5,30	96,38	139,64	176,99
	1,90	5,36	94,79	142,46	177,96
	1,91	5,01	92,64	134,73	175,21
2	1,89	5,35	94,19	139,07	173,39
	1,89	5,28	90,3	137,33	170,64
	2,09	5,55	95,91	135,54	179,23
3	2,06	5,65	100,18	160,66	182,22
	2,11	5,94	103,14	160,17	249,61
	2,06	5,73	101,57	156,78	189,72
4	2,07	5,90	106,09	176,15	241,68
	2,08	5,57	98,38	140,18	183,52
	1,66	4,88	95,16	142,95	167,07
5	1,79	5,02	95,79	126,61	174,14
	1,75	5,15	89,39	128,78	159,53
	1,71	4,90	87,31	143,96	165,51
6	1,92	5,48	89,78	140,71	162,49
	1,85	5,28	91,46	138,37	167,83
среднее значение (n=18)	1,92	5,35	95,5	143,3	182,16
S.D. (n=18)	0,14	0,33	5,03	12,47	24,42
RSD, % (n=18)	7,15	6,08	5,27	8,70	13,40
ε, %	-4,08	-2,66	4,51	-4,47	-8,92
Общая ошибка, %	11,23	8,73	9,77	13,17	22,33

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствовали нормам (не более 25% для верхнего и нижнего диапазона линейности, не более 20% для остальных точек).

4. *Минимально необходимое разведение.* Оценку минимального необходимого разведения образцов с целью устранения влияния матрицы проводили с использованием образца контроля качества с концентрацией бевацизумаба 2,00 мкг/мл, который был приготовлен на сыворотке крови человека, с последующим разбавлением в 500 и в 1000 раз. Для каждого разведения анализировали образцы в трех повторках. Выбор оптимального разведения осуществляли на основании расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %) для полученных данных. Оптимальным было признано разведение 1:1000.
5. *Возможность разведения образцов.* Подтверждалась при анализе образцов с концентрацией, превышающей верхний калибровочный уровень (образец бевацизумаба с концентрацией 380 мкг/мл, который при анализе разбавляли в 2 раза с помощью интактной сыворотки крови). Анализ проводили для 6 повторностей образцов. Для полученных результатов рассчитывали значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности после пересчета с учетом фактора разведения. Полученные значения относительного стандартного отклонения и относительной погрешности соответствовали нормам НД (не превышали $\pm 20\%$), что свидетельствует о возможности разведения образцов в случае, если это необходимо (например, если значения для исследуемых образцов превышают верхний калибровочный уровень 200 мкг/мл).
6. *Стабильность образцов.* При валидации методики оценивали краткосрочную стабильность (хранение в течение 6 часов при комнатной температуре), стабильность после 3 циклов заморозки-разморозки (каждый цикл в течение 12 часов), а также долгосрочную стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки в течение 104 и 250 дней). Для оценки стабильности использовали образцы контроля качества с концентрациями бевацизумаба 5,50 и 150,00 мкг/мл. Стабильность образцов оценивалась путем расчета относительной погрешности для полученных значений концентрации бевацизумаба в образцах. Для всех видов стабильности значения относительной погрешности не превышали допустимых пределов ($\pm 20\%$ от номинального значения концентрации бевацизумаба в образце).

Валидация методики определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови проводилась на основании FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection, January 2019 [8] по следующим валидационным параметрам:

1. *Предел исключения (cut-point) для этапа скрининга образцов.* Предел исключения методики определяли на основании данных анализа 50 образцов интактной сыворотки крови здоровых добровольцев. Анализ проводился в течение 3 дней, двумя аналитиками. Всего было выполнено 6 циклов. В каждый цикл помимо образцов интактной сыворотки крови включались контрольные образцы High Positive Control и Low Positive Control (HPC, LPC), а также не менее 3 образцов Negative control (NC) в дублях (общее число – 6 образцов). Для полученных результатов (N=300) проводили статистическую обработку с использованием ПО Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Определение предела исключения проводили в соответствии с алгоритмами, описанными в статье Shankar et al., 2008 [9] и в Руководстве FDA [8].

На первом этапе была проведена проверка полученных данных на нормальное распределение с помощью теста Шапиро-Уилка. Данные соответствовали ненормальному распределению, поэтому была проведена процедура исключения выбросов и логарифмическое преобразование значений. Выбросами были признаны значения, которые не входили в диапазон

$$[Q1 - (1,5IQR)]; [Q3 + (1,5IQR)],$$

где Q1 – первый квартиль; Q3 – третий квартиль; IQR – межквартильный размах. Во всех 6 циклах были исключены 2 значения (биологические выбросы), в цикле 4 был также дополнительно исключено 1 значение (аналитический выброс). После исключения выбросов проводили логарифмическое преобразование данных и повторную проверку преобразованных значений на нормальное распределение, которая также показала ненормальное распределение. На основании полученных результатов для определения предела исключения был выбран непараметрический метод с применением 95-го процентиля. Данные для определения cut-point в каждом цикле с использованием 95-го процентиля приведены в таблице 3.

Таблица 3. 95-й процентиль (предел исключения) для общих данных и для каждого цикла

Table 3. 95th percentile (cut-point) for pooled data and for each analytical cycle

Исследуемые значения		95-й процентиль
Общие данные (до исключения выбросов)		0,019
Общие данные (после логарифмической трансформации и исключения выбросов)		-1,9208
Аналитик 1	Цикл 1	0,012
	Цикл 2	0,013
	Цикл 3	0,014
Аналитик 2	Цикл 1	0,013
	Цикл 2	0,014
	Цикл 3	0,014

На втором этапе проводилась оценка однородности дисперсий и средних значений между всеми циклами и между аналитиками. Оценка однородности

средних проводилась с использованием ANOVA, оценка однородности дисперсий проводилась с использованием Levene's-теста. Дисперсии и средние значения между циклами и между аналитиками были признаны однородными. На основании однородности дисперсий и средних значений в исследовании допустимо использование фиксированного предела исключения (fixed cut-point), а также в случае необходимости – плавающего предела исключения (floating cut-point). Значение фиксированного предела исключения составило 0,013 OE. Для дальнейшего использования при проведении аналитической части исследования нами был выбран плавающий предел исключения. Для его определения требуется фактор нормализации (NF), который рассчитывали по формуле:

$$NF = \text{Фикс. предел исключения} - \text{Ср. знач. оптич. плотности 6 NC.}$$

При проведении аналитической части исследования плавающий предел исключения рассчитывали для каждого цикла как среднее значение оптической плотности 6 образцов Negative Control плюс значение фактора нормализации. Значения рассчитанного предела исключения и фактора нормализации (общее и по каждому из 6 циклов) приведены в таблице 4.

Таблица 4. Рассчитанные значения фиксированного предела исключения и фактора нормализации (NF)

Table 4. The calculated values of fixed cut-point and normalization factor (NF)

№ цикла	Аналитик	Предел исключения, OE	Ср.знач. ОП 6 образцов Negative Control	Фактор нормализации, OE
1	1	0,012	0,007	0,005
2	1	0,013	0,007	0,006
3	1	0,014	0,008	0,006
1	2	0,013	0,008	0,005
2	2	0,014	0,008	0,006
3	2	0,014	0,008	0,006
Аналитик 1		0,013	0,007	0,006
Аналитик 2		0,014	0,008	0,006
Ср. значение (циклы 1-6)		0,013	0,008	0,006

2. *Селективность.* Для определения селективности использовались образцы интактной сыворотки крови здоровых добровольцев. Данные образцы подвергались анализу в формате скрининга, и среди них не было выявлено «потенциально положительных» образцов. Значения ОП исследованных образцов не превышали значения ранее определенного предела исключения для этапа скрининга, что показывает достаточную селективность валидируемой методики.

3. *Чувствительность.* Чувствительность методики (предел детектирования) была определена производителем иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) ADA и, согласно Product Specifications Data Sheet, составила 63 нг/мл в сыворотке крови человека.
4. *Прецизионность.* Для оценки прецизионности методики на этапе скрининга проводили анализ образцов High Positive Control и Low Positive Control (по 6 образцов каждого контроля). Анализ проводили для 3 последовательностей. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательности (между циклов). Исследование проводилось двумя аналитиками, всего для оценки прецизионности было выполнено 6 циклов. Для полученных значений оптической плотности были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %). Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) как внутри цикла (intra day), так и между циклами (inter day) соответствовали нормам (не более 20% на уровне LPC и 15% на уровне NPC).
5. *Тест на разведение.* Тест на разведение проводили путем разведения образца High Positive Control раствором Assay buffer до получения отклика ниже, чем ранее установленный предел исключения (screening cut-point). Всего было приготовлено 3 независимые серии разведений по 5 образцов (разведения 1:25, 1:50, 1:100, 1:250, 1:400). Оптическая плотность образца с разведением 1:400 во всех сериях была ниже установленного предела исключения.
6. *Эффект матрицы (при выраженном гемолизе).* Для оценки возможного влияния матрицы (сыворотки крови) в случае выраженного гемолиза образцов на результаты определения антител к бевацизумабу проводили исследование образцов интактной гемолизной сыворотки крови с добавлением NPC и LPC. Анализ проводился по схеме скрининга образцов, все образцы были признаны «положительными» на основании сравнения с пределом исключения для этапа скрининга. Одновременно проводился анализ образцов интактной гемолизной сыворотки крови без добавления NPC и LPC. На основе сравнения полученных значений оптической плотности образцов интактной гемолизной сыворотки крови без добавления контрольных образцов с пределом исключения, образцы интактной гемолизной сыворотки крови были признаны «отрицательными». Полученные результаты свидетельствуют о возможности детектирования антител к бевацизумабу в случае незначительного гемолиза исследуемых образцов сыворотки.
7. *Толерантность (устойчивость) методики к присутствию ЛП (Drug tolerance).* Толерантность разработанной методики к присутствию исходного биотех-

нологического препарата в образцах была заранее определена производителем иммуноферментной тест-системы Bevacizumab (Avastin®) ADA и, согласно Product Specifications Data Sheet, составила 4,3 мкг/мл. Это означает, что производитель гарантирует отсутствие ложноотрицательных результатов анализа в случае присутствия в образцах сыворотки крови бевацизумаба в концентрации до 4,3 мкг/мл.

8. *Стабильность образцов.* При валидации методики оценивали краткосрочную стабильность (хранение в течение 24 часов при комнатной температуре), стабильность после 2 циклов заморозки-разморозки (каждый цикл в течение 12 часов), а также долгосрочную стабильность (хранение в условиях низкотемпературной заморозки в течение 134 и 259 дней). Для оценки стабильности использовали образцы положительного контроля на двух уровнях High Positive Control и Low Positive Control. Стабильность образцов оценивалась путем расчета относительного стандартного отклонения для полученных значений оптической плотности в образцах. Для всех изученных видов стабильности значения относительного стандартного отклонения не превышали допустимых пределов ($\pm 20\%$).

Применение валидированных методик для проведения аналитической части исследования фармакокинетической эквивалентности и безопасности препаратов бевацизумаба.

Валидированные методики были успешно применены на практике для проведения аналитической части клинического исследования по протоколу: «Двойное слепое рандомизированное сравнительное, в параллельных группах, клиническое исследование фармакокинетики и безопасности препаратов RPH-001 (АО «Р-Фарм», Россия) и Авастин® (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) при однократном внутривенном введении у здоровых добровольцев».

В ходе проведения сравнительного исследования фармакокинетики препаратов бевацизумаба было выполнено 18 аналитических циклов, в каждый из которых были включены калибровочные образцы и исследуемые образцы от добровольцев (в дублях). Для каждого аналитического цикла на основании средних значений ОП калибровочных образцов для двух повторов строили калибровочный график. Калибровочная зависимость отношения оптической плотности и концентрации описывалась уравнением 4PL-функции вида:

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p},$$

откуда

$$x = x_0 \cdot \left(\frac{A1 - A2}{y - A2} - 1 \right)^{\frac{1}{p}}. \quad (2)$$

Определение значений концентрации бевацизумаба в образцах от добровольцев проводилось непосредственно по калибровочному графику с использованием уравнения 2. Для полученных значений концентраций бевацизумаба были рассчитаны основные фармакокинетические параметры, а также построены фармакокинетические профили (после исключения добровольцев, которые по каким-либо причинам были из исследования), приведенные на рисунке 2.

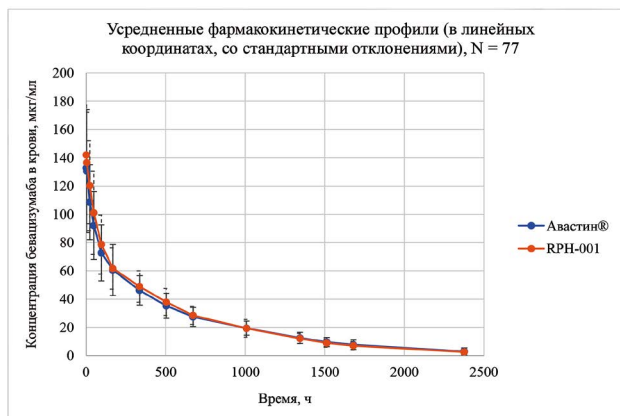


Рисунок 2. Фармакокинетические профили тестового препарата (RPH-001) и референтного препарата (Авастин®)

Figure 2. PK-profiles for test drug (RPH-001) and reference drug (Avastin®)

Индивидуальные профили изменения значений концентраций бевацизумаба в сыворотке крови во времени, зарегистрированные после приема препаратов RPH-001 (Т) и Авастин® (R), характеризовались максимальной концентрацией лекарственного вещества (C_{max} , наибольшее из измеренных значений) и временем ее достижения (t_{max}), площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови (AUC_{0-t}), рассчитанной методом трапеций, площадью под кривой «концентрация – время» в пределах от нуля до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), а также периодом полувыведения бевацизумаба из организма ($t_{1/2}$).

Максимальная концентрация бевацизумаба после приема добровольцами препарата RPH-001 и препарата Авастин® составила $C_{max}=151,29\pm 33,11$ мкг/мл и $C_{max}=147,38\pm 36,08$ мкг/мл, соответственно. Время достижения максимальной концентрации бевацизумаба составило $t_{max}=6,44\pm 8,27$ ч. для препарата RPH-001 и $t_{max}=5,54\pm 8,98$ ч. для препарата Авастин®. Бевацизумаб элиминировался из крови со средним значением $t_{1/2}=518,51\pm 109,85$ ч. для тестового препарата и $561,66\pm 142,91$ ч. для референтного препарата. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ бевацизумаба после приема препарата RPH-001 составили $55790,18\pm 11927,37$ мкг · ч/мл и $58901,99\pm 12528,88$ мкг · ч/мл, соответственно. Значения AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ бевацизумаба после приема препа-

рата Авастин® составили $54564,50\pm 11205,10$ мкг · ч/мл и $58706,93\pm 12819,40$ мкг · ч/мл, соответственно.

Доверительные интервалы для отношения средних значений C_{max} и AUC_{0-t} бевацизумаба составили 94,63–112,76% и 94,21–110,43%, соответственно. Полученные доверительные интервалы лежат в пределах, установленных Протоколом (80,00–125,00)% для AUC_{0-t} и (75,00–133,00)% для C_{max} , что позволяет сделать вывод о биоэквивалентности исследуемых препаратов.

В ходе проведения исследования иммуногенности (безопасности) препаратов бевацизумаба было выполнено 12 аналитических циклов. В состав каждого аналитического цикла были включены контрольные образцы, образцы интактной сыворотки крови человека (для определения предела исключения конкретного цикла) и исследуемые образцы сыворотки от добровольцев. Для каждого аналитического цикла плавающий предел исключения определяли на основании 6 значений ОП для образцов интактной сыворотки крови человека с прибавлением рассчитанного на этапе валидации методики фактора нормализации ($NF=0,006$ о.е.). Расчет плавающего предела исключения проводили по следующей формуле:

$$\text{Cut-point} = \text{Ср.знач. (ОПblank)} + NF,$$

где Cut-point – предел исключения (для этапа скрининга); Ср.знач. (ОП blank) – среднее значение ОП 6 образцов интактной сыворотки крови; NF – фактор нормализации (рассчитанный на этапе валидации методики).

Исходя из полученных результатов ни у одного из здоровых добровольцев, которым были введены препараты бевацизумаба не было выявлено антител к бевацизумабу (все пробы по результатам скрининга были признаны «отрицательными» на наличие антител к бевацизумабу). Полученные результаты соответствовали ожиданиям, поскольку а) в исследование были включены здоровые добровольцы, б) проводилось однократное дозирование, с) Авастин® не характеризуется высокой иммуногенностью. Так, в клинических исследованиях препарата Авастин®, применяемого в качестве адъювантной терапии солидных опухолей, антитела к бевацизумабу были выявлены только у 0,6% (14/2233) пациентов [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена сравнительная оценка фармакокинетики и безопасности оригинального биотехнологического лекарственного препарата Авастин® (производитель: Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и препарата-биоаналога RPH-001 (производитель АО «Р-Фарм», Россия) при однократном внутривенном введении здоровым добровольцам. Для проведения исследования были валидированы две методики: методика количественного определения бевацизумаба в сыворотке крови человека (ФК-мето-

дика) и методика полуколичественного определения антител к бевацизумабу в сыворотке крови (ADA-методика). ФК-методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность и специфичность, калибровочная кривая, чувствительность, точность и прецизионность, минимально необходимое разведение, возможность разведения образцов и стабильность. ADA-методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: предел исключения (cut-point) с расчетом фактора нормализации, селективность, чувствительность, прецизионность, толерантность к лекарственному препарату, тест на разведение, эффект матрицы (при выраженном гемолизе) и стабильность. Валидированные методики были успешно применены для проведения аналитической части исследования. По результатам проведения сравнительного исследования фармакокинетики препаратов бевацизумаба, тестовый (RPH-001) и референтный (Авастин®) препараты были признаны биоэквивалентными. По результатам проведения анализа иммуногенности все пробы добровольцев были признаны «отрицательными» на наличие антител к бевацизумабу.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO fact sheet «Cancer». 12.09.2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Имянитов Е. Н. Общие представления о таргетной терапии. *Практическая онкология*. 2010; 11(3): 123–130.
3. Феоктистова П. С., Загинайко А. В., Симанович Е. Э., Жаркова О. В., Миронова Е. Б., Карасева В. В., Хайленко В. А. Таргетная терапия метастатического колоректального рака. *Онкология. Журнал им. П. А. Герцена*. 2013; 2(3): 31–35.
4. Drug Bank: bevacizumab. Accession Number: DB00112. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.
5. Государственный реестр лекарственных средств. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=f33b36db-9d61-43bf-aaaf-ab6ff4697ff9&CIPermGUID=A0624183-5D1D-4E5C-9704-CDBF9EB6D3D7>.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под ред. проф. А. Н. Миронова. Том I. – М.: Гриф и К. 2013: 328.
7. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.
8. FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. 2019; 1.
9. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y. C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L. A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 48(5): 1267–81.
10. Genentech Inc. Avastin® (bevacizumab) prescribing information. 2004 (last update 06. 2019). Available at: https://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf.
3. Feoktistova P. S., Zaginayko A. V., Simanovich E. E., Zharkova O. V., Mironova E. B., Karaseva V. V., Khaylenko V. A. Targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *P. A. Herzen Journal of Oncology*. 2013; 2(3): 31–35 (in Russ.).
4. Drug Bank: bevacizumab. Accession Number: DB00112. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>.
5. State register of medicines. Available at: <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionMini.aspx?CIStatementGUID=f33b36db-9d61-43bf-aaaf-ab6ff4697ff9&CIPermGUID=A0624183-5D1D-4E5C-9704-CDBF9EB6D3D7> (in Russ.).
6. Mironov A. N. (edit.) Guideline on expertise of medicines. Vol. I. – М.: Гриф и К. 2013: 328 (in Russ.).
7. Rules for conducting bioequivalence studies of drug products on the territory of EAEU. 2016 (in Russ.).
8. FDA Guidance for Industry Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. 2019; 1.
9. Shankar G., Devanarayan V., Amaravadi L., Barrett Y. C., Bowsher R., Finco-Kent D., Fiscella M., Gorovits B., Kirschner S., Moxness M., Parish T., Quarmby V., Smith H., Smith W., Zuckerman L. A., Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 48(5): 1267–81.
10. Genentech Inc. Avastin® (bevacizumab) prescribing information. 2004 (last update 06. 2019). Available at: https://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf.

REFERENCES

1. WHO fact sheet «Cancer». 12.09.2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Imyaninov E. N. General principles of targeted therapy. *Practical Oncology*. 2010; 11(3): 123–130 (in Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-101-106>
УДК 615.03:615.72



Оригинальная статья/Research article

Планирование и оценка исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов телмисартана

А. Л. Хохлов², Д. П. Ромодановский^{1*}, А. Е. Мирошников²

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2
2 – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 150000, Россия, Ярославль, ул. Революционная, д. 5

*Контактное лицо: Ромодановский Дмитрий Павлович. E-mail: Romodanovsky@expmed.ru

ORCID: А. Л. Хохлов – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>. Д. П. Ромодановский – <https://orcid.org/0000-0002-2980-4518>. А. Е. Мирошников – <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>

Статья получена: 05.07.2019. Статья принята к печати: 19.08.2019

Резюме

Введение. Телмисартан – современное антигипертензивное лекарственное средство, из группы антагонистов рецепторов ангиотензина II, которое, в последнее время, является целью разработки и регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов. Фармацевтическая разработка воспроизведенных препаратов телмисартана и их изучение в исследованиях биоэквивалентности осложняется многими факторами, влияющими на результаты сравнения с референтным препаратом. Поэтому актуальным является изучение данных факторов для правильного планирования исследований и оценки их результатов воспроизведенных препаратов телмисартана.

Цель. Целью исследования является выявление ключевых факторов, которые следует учитывать при планировании и оценки исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов телмисартана.

Материалы и методы. Для выявления ключевых факторов, влияющих на планирование и оценку исследований воспроизведенных препаратов телмисартана провели ретроспективный анализ результатов семи исследований телмисартана. Рассчитали фармакокинетические параметры C_{max} , AUC_{0-t} , t_{max} ; их усредненные значения; значения внутрииндивидуальной вариабельности для каждого исследования и взвешенные средние полученных коэффициентов внутрииндивидуальной вариабельности.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования продемонстрировали, что препараты телмисартана являются высоковариабельными, в фармакокинетике телмисартана имеются половые различия. Согласно усредненным значениям концентраций и фармакокинетическим профилям телмисартана определены: область максимальной экспозиции телмисартана, длительность и график отбора проб крови, для получения оптимального фармакокинетического профиля. Наиболее оптимальный метод определения телмисартана – ВЭЖХ МС/МС с НПКО в диапазоне 0,5–3 нг/мл. Рассчитана верхняя граница 90% доверительного интервала для взвешенного среднего коэффициентов внутрииндивидуальной вариабельности полученных в рассмотренных исследованиях.

Заключение. Разработаны рекомендации к планированию и оценке исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов телмисартана. Следует планировать исследования биоэквивалентности с повторным дизайном в трех или четырех периодах, с двумя перекрестами, с двумя последовательностями приема препаратов. Для оценки фармакокинетики телмисартана следует использовать приведенные в статье данные о его экспозиции. При определении размера выборки следует ориентироваться на верхнюю границу доверительного интервала усредненных значений коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности C_{max} телмисартана (45%). Оценку результатов следует проводить с учетом возможности масштабирования границ биоэквивалентности для параметра C_{max} . Граница биоэквивалентности для параметра AUC_{0-t} должна оставаться в диапазоне 80,00–125,00%, как и отношение геометрических средних для обоих параметров.

Ключевые слова: телмисартан, биоэквивалентность, высокая внутрииндивидуальная вариабельность, половые различия, дизайн исследований.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. Л. Хохлов, Д. П. Ромодановский, А. Е. Мирошников придумали и разработали методологию исследования. Д. П. Ромодановский выполнил сбор данных и статистические расчеты. А. Е. Мирошников подготовил обзор литературы и описал методологию. Д. П. Ромодановский, А. Е. Мирошников участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Хохлов А. Л., Ромодановский Д. П., Мирошников А. Е. Планирование и оценка исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов телмисартана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(3): 101–106.

Planning and Evaluation of Bioequivalence Studies of Telmisartan Generic Drug Products

Alexandr L. Khokhlov², Dmitry P. Romodanovsky¹, Alexey E. Miroshnikov^{2*}

1 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russia

2 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Yaroslavl State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 5, Revolutionary str., Yaroslavl, 150000, Russia

*Corresponding author: Dmitry P. Romodanovsky. E-mail: Romodanovsky@expmed.ru

ORCID: A. L. Khokhlov – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>. D. P. Romodanovsky – <https://orcid.org/0000-0002-2980-4518>. A. E. Miroshnikov – <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>

Received: 05.07.2019. Accepted: 19.08.2019

Abstract

Introduction. Telmisartan is a modern antihypertensive drug, from the group of angiotensin II receptor antagonists, which, recently, has been the purpose of the development and registration of generic drug. The pharmaceutical development of telmisartan generics and their evaluation in bioequivalence studies is complicated by many factors that influence the results of comparison with the reference drug. Therefore, it is relevant to study these factors for the proper planning of studies and for evaluating their results from the generic drugs of telmisartan.

Aim. The aim of the study is to identify the key factors that should be considered in planning and evaluation of bioequivalence studies of telmisartan's generics.

© Хохлов А. Л., Ромодановский Д. П., Мирошников А. Е., 2019
© Khokhlov A. L., Romodanovsky D. P., Miroshnikov A. E., 2019

Materials and methods. To identify the key factors influencing the planning and evaluation of studies of telmisartan generics, a retrospective analysis of the results of seven telmisartan studies was conducted. Calculated pharmacokinetic parameters C_{max} , AUC_{0-t} , t_{max} ; their average values; the values of intraindividual variability for each study and the average of the coefficients of intraindividual variability obtained.

Results and discussion. The results of the study demonstrated that the drugs of telmisartan are highly variable, there are sex differences in the pharmacokinetics of telmisartan. According to the averaged values of the concentrations and pharmacokinetic profiles of telmisartan, the following areas were determined: the area of maximum exposure of telmisartan, the duration and schedule of blood sampling, to obtain the optimal pharmacokinetic profile. The most optimal method for the determination of telmisartan is HPLC MS/MS with a lower limit of quantification in the range of 0.5–3 ng/ml. The upper limit of the 90% confidence interval was calculated for the pooled average of the coefficients of intraindividual variability obtained in the considered studies.

Conclusion. Recommendations were developed for planning and evaluating bioequivalence studies of generic telmisartan preparations. It is necessary to plan bioequivalence studies with replicated design in three or four periods, with two crossovers, with two sequences of drug intake. To assess the pharmacokinetics of telmisartan one should use the data on its exposure given in the article. When determining the sample size, one should be guided by the upper limit of the confidence interval of the averaged values of the coefficient of intra-individual variability C_{max} of telmisartan (45%). Evaluation of results should be carried out taking into account the possibility of scaling bioequivalence limits for the C_{max} . The bioequivalence limit for the AUC_{0-t} parameter should remain in the range of 80.00–125.00%, as well as the ratio of geometric means for both parameters.

Keywords: telmisartan, bioequivalence, high intraindividual variability, sex differences, study design.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. A. L. Khokhlov, D. P. Romodanovsky, A. E. Miroshnikov invented and developed a research methodology. D. P. Romodanovsky performed data collection and statistical calculations. A. E. Miroshnikov prepared a literature review and described the methodology. D. P. Romodanovsky, A. E. Miroshnikov participated in the writing of the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Khokhlov A. L., Romodanovsky D. P., Miroshnikov A. E. Planning and evaluation of bioequivalence studies of telmisartan generic drug products. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 101–106.

ВВЕДЕНИЕ

Телмисартан один из современных антигипертензивных лекарственных препаратов, который имеет ряд преимуществ по сравнению с другими препаратами группы антагонистов рецепторов ангиотензина II [1]. В настоящее время регистрируется достаточно большое количество воспроизведенных препаратов телмисартана. За последние 5 лет на рынке появилось 7 воспроизведенных препаратов.

Разработка воспроизведенных препаратов телмисартана имеет свои особенности. Незначительные различия состава вспомогательных веществ могут оказать значимое влияние на растворение лекарственной формы и соответственно биодоступность воспроизведенного лекарственного препарата по отношению к референтному [2]. Так различия вспомогательных веществ разрабатываемого и референтного препаратов могут привести к неэквивалентным результатам сравнительного теста кинетики растворения препаратов *in vitro* в различных средах растворения. Проведение исследования биоэквивалентности для оценки сравниваемых препаратов *in vivo* в таком случае будет иметь высокий риск получения также не эквивалентных результатов. Таким образом, для успешного вывода на фармацевтический рынок воспроизведенного препарата телмисартана следует уделить особое внимание его фармацевтической разработке и испытаниям растворения *in vitro*.

По данным зарубежной литературы телмисартан демонстрирует высокую внутрииндивидуальную вариабельность в исследованиях биоэквивалентности. [3]. Высокая внутрииндивидуальная вариабельность фармакокинетических параметров демонстрируется, когда коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности, рассчитанный на основе данных среднеквадратичной ошибки после дисперсионного

анализа, превышает 30% [4]. Высокая внутрииндивидуальная вариабельность параметров фармакокинетики также повышает риск получения не эквивалентных результатов при неправильном планировании исследования и оценке его результатов. Помимо описанных, существуют и другие факторов, которые, могут оказать влияние на результаты исследования биоэквивалентности [5]. В связи с этим актуальным является проведение ретроспективного анализа результатов исследований биоэквивалентности с целью выявления ключевых факторов, которые следует учитывать при планировании и оценки исследований биоэквивалентности воспроизведенных препаратов телмисартана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективный фармакокинетический анализ телмисартана вошли результаты 7 исследований биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов. Проанализированы данные 370 субъектов. Для каждого субъекта были определены C_{max} (максимальная концентрация), AUC_{0-t} (площадь под кривой «концентрация время» в интервале времени от 0 до времени забора крови с определяемой концентрацией вещества) и t_{max} (время достижения максимальной концентрации). С использованием значений концентраций телмисартана построены усредненные фармакокинетические профили на смоделированной временной шкале, объединяющей все не дублирующиеся временные точки рассмотренных графиков отбора крови. AUC_{0-t} рассчитывали методом трапеций. Фармакокинетические параметры C_{max} и AUC_{0-t} были логарифмически преобразованы и подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA). В дисперсионный анализ были включены следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариацию данных: «последова-

тельность», «добровольцы», «период», «препарат». На основании полученных значений среднеквадратичной ошибки были рассчитаны значения коэффициента CV_{intra} для C_{max} и AUC_{0-t} . Было рассчитано взвешенное среднее значений CV_{intra} исследований для C_{max} и AUC_{0-t} . Расчеты фармакокинетических параметров, CV_{intra} были выполнены с применением программ SSPS Statistics v. 25. и Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ результатов 7 исследований биоэквивалентности. Во всех исследованиях биоэквивалентности изучалась дозировка телмисартана – 80 мг. В качестве препарата сравнения во всех исследованиях был референтный препарат Микардис® в соответствующей дозировке.

Все исследования были выполнены с простым перекрестным дизайном, в двух периодах, двух последовательностях, при однократном приеме исследуемого препарата и препарата сравнения натощак.

Количество здоровых добровольцев в исследованиях варьировало от 36 до 85 (таблица 1).

В большинстве исследований длительность забора образцов крови для фармакокинетического анализа была 72 ч или более (таблица 2). Среднее время достижения максимальной концентрации исследуемого и референтного препаратов составило $1,33 \pm 0,50$ и $1,12 \pm 0,44$, соответственно (таблица 3).

Усредненные значения концентраций телмисартана после приема исследуемых и референтных препаратов всеми субъектами, включенными в рассмотренные исследования, объединили и привязали к смоделированному графику времени отбора проб крови (объединены все не дублирующиеся точки отбора). Соответствующие фармакокинетические профили представлены на рисунке 1. По горизонтальной оси

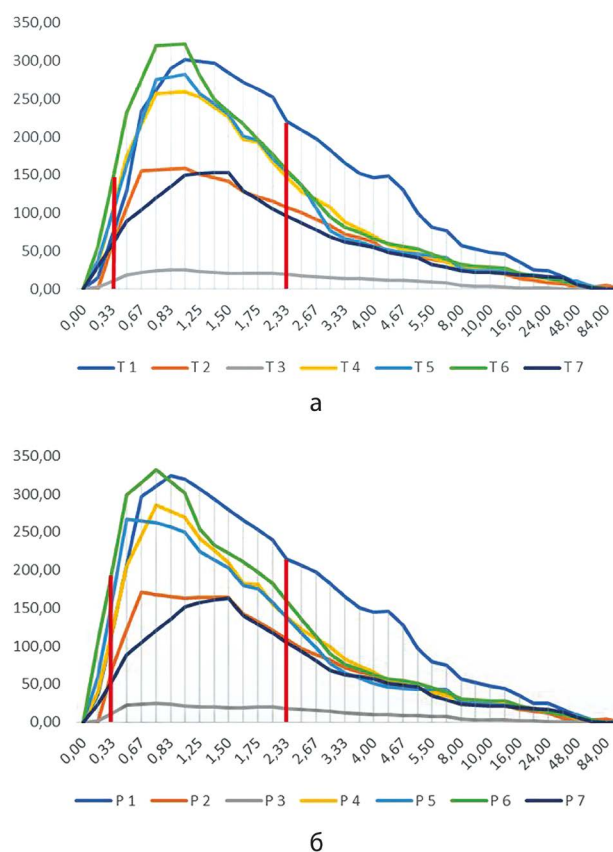


Рисунок 1. Усредненные фармакокинетические профили.

Примечание: а – фармакокинетические профили исследуемых препаратов; б – фармакокинетические профили препаратов сравнения; T1-T7 и P1-P7 – нумерация исследований биоэквивалентности, вошедших в анализ

Figure 1. Averaged pharmacokinetic profiles.

Note: a – pharmacokinetic profiles of the studied drugs; b – pharmacokinetic profiles of comparison drugs; T1-T7 and P1-P7 – numbering of bioequivalence studies included in the analysis

Таблица 1. Усредненные фармакокинетические параметры и период отмычки

Table 1. Averaged pharmacokinetic parameters and washout period

№	C_{max} T, нг/мл	C_{max} R, нг/мл	AUC_{0-t} T, нг*ч/мл	AUC_{0-t} R, нг*ч/мл	t_{max} T, ч	t_{max} R, ч	Период отмычки, сут
1	424,93	440,65	2107,95	2133,27	$1,62 \pm 0,96$	$1,27 \pm 0,86$	10
2	205,78	222,67	1051,73	1177,79	$1,16 \pm 0,64$	$1,22 \pm 0,65$	14
3	35,47	34,62	152,84	142,50	$1,27 \pm 0,87$	$1,14 \pm 0,83$	14
4	620,79	618,88	1619,22	1189,25	$1,07 \pm 0,52$	$0,98 \pm 0,39$	14
5	366,92	383,36	1541,57	1474,95	$1,12 \pm 0,50$	$0,99 \pm 0,57$	7
6	416,11	453,44	1509,57	1535,73	$1,07 \pm 0,52$	$0,99 \pm 0,52$	7
7	216,68	218,09	1211,51	1233,05	$1,33 \pm 0,58$	$1,28 \pm 0,56$	10
Mean	326,67	338,82	1313,48	1269,51	1,33	1,12	
SD	190,30	193,44	611,16	597,98	0,50	0,44	

Примечание: C_{max} – максимальная концентрация в крови; AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови; t_{max} – время достижения максимальной концентрации; T – исследуемый препарат; R – референтный препарат; Mean – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение.

Note: C_{max} – maximum concentration in the blood; AUC_{0-t} is the area under the curve «concentration time» in the time interval from 0 to the time t of the last blood sample; t_{max} – time to reach maximum concentration; T – study drug; R is the reference drug; Mean – arithmetic mean; SD is the standard deviation.

указаны объединенные временные точки всех семи проанализированных исследований, по вертикальной оси указаны концентрации телмисартана в указанных временных точках. Красными вертикальными линиями выделена область максимальной экспозиции телмисартана, которую следует учитывать при выборе точек отбора крови вблизи предполагаемого t_{max} .

Согласно сведениям, содержащимся в инструкции референтного препарата, период полувыведения телмисартана составляет 20 часов¹. Таким образом, при выборе точек забора образцов крови для фармакокинетического анализа следует учитывать общую длительность 72 ч (так как для препаратов с немедленным высвобождением и быстрой абсорбцией отбор образцов крови более 72 ч не требуется), и более частый отбор образцов крови в диапазоне времени достижения C_{max} (0,5–2,5 ч) (рисунок 1). Период отмывки с учетом длительности периода полувыведения должен быть более 5 дней.

В протоколе исследования стоит учитывать, что субъекты должны находиться в положении лежа до 8 часов после приема препаратов телмисартана в дозировке 80 мг, и оставаться под медицинским наблюдением до 12 часов после приема препаратов из-за риска изменения артериального давления и ортостатических реакций (включая тошноту, головокружение или обморок).

С учетом наличия половых различий в фармакокинетике телмисартана (в 3 и 2 раза большие значения C_{max} и AUC у женщин, соответственно)^{1,2} не следует включать в исследование субъектов только мужского пола, т.к. доказательство биоэквивалентности на выборке субъектов мужского пола может привести к тому, что на рынок выйдет воспроизведенный препарат не эквивалентный у популяции пациентов другого пола [6].

В проанализированных исследованиях для определения концентраций телмисартана использовался аналитический метод – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрической детекцией, tandemной масс-спектрометрической и флуориметрической детекцией.

В зависимости от использованного аналитического метода нижний предел количественного определения (НПКО) варьировал от 0,05 до 10 нг/мл (таблица 2).

При выборе аналитического метода следует отдавать предпочтение ВЭЖХ МС/МС, т.к. данные методики позволяют более точно определить концентрации телмисартана. На рисунке 1 видно, что в

исследованиях с применением ВЭЖХ МС/МС и нижнем пределом количественного определения от 0,5 до 3 нг/мл получены более высокие значения концентрации телмисартана.

Таблица 2. Нижний предел количественного определения аналитических методов и схема забора крови

Table 2. The lower limit of quantitative determination of analytical methods and the scheme of blood sampling

№	Временные точки	Аналитический метод	НПКО, нг/мл
1	0; 0,25; 0,5; 0,67; 0,83; 1; 1,33; 1,67; 2; 2,33; 2,67; 3; 3,33; 3,67; 4; 4,33; 4,67; 5; 5,5; 6; 8; 10; 12; 18; 24; 48; 72	ВЭЖХ МС/МС	0,5
2	0; 0,33; 0,66; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 9; 12; 24; 36; 48; 72; 84	ВЭЖХ МС	10
3	0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 48; 72	ВЭЖХ ФЛУ	5
4	0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72; 96	ВЭЖХ МС/МС	3
5	0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 24; 36; 48	ВЭЖХ МС	2,5
6	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5; 8; 12; 24; 36; 48; 72	ВЭЖХ МС/МС	2
7	0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72; 96	ВЭЖХ МС/МС	10

Примечание: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; МС – масс спектрометрическая детекция; МС/МС – tandemная масс спектрометрическая детекция; ФЛУ – флуориметрическая детекция; НПКО – нижний предел количественного определения.

Note: HPLC – high performance liquid chromatography; MS – mass spectrometric detection; MS/MS – tandem mass spectrometric detection; FLU – fluorimetric detection; NPKO – the lower limit of quantification.

По результатам ретроспективного анализа было выявлено, что $CV_{intra} AUC_{0-t}$ превышает 30% в 3 исследованиях. $CV_{intra} C_{max}$ было выше 30% во всех рассмотренных исследованиях (таблица 3).

Таким образом, препараты телмисартана относятся к высоковариабельным лекарственным препаратам, верхняя граница 90% доверительного интервала усредненного («пулированного») значения коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности телмисартана составила 44,8% (таблица 3). В руководстве Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств Соединенных Штатов Америки (Food and Drug Administration, FDA) по планированию исследований биоэквивалентности телмисартана также указано на его высокую внутрииндивидуальную вариабельность³.

³ Product-Specific Guidances for telmisartan. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Telmisartan_tabs_20850_RC5-08.pdf.

¹ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Микардис®. [https://grls.rosminzdrav.ru/InstrImg/0000086159/%D0%9F_N015387_01-151209\[2013\]_3_1.pdf](https://grls.rosminzdrav.ru/InstrImg/0000086159/%D0%9F_N015387_01-151209[2013]_3_1.pdf).

² Summary of product characteristics Micardis®. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/micardis-epar-product-information_en.pdf.

Таблица 3. Внутрииндивидуальная вариабельность телмисартана и количество субъектов**Table 3.** Intraindividual variability of telmisartan and the number of subjects

№	Количество субъектов	$CV_{intra} AUC_{0-t}$, %	$CV_{intra} C_{max}$, %
1	85	21,94	43,27
2	36	21,86	32,72
3	40	27,79	33,67
4	59	25,24	48,35
5	60	35,29	49,45
6	50	14,78	34,12
7	40	34,39	55,34
8	85	21,94	43,27
9	36	21,86	32,72
10	40	27,79	33,67
CV_{pooled} , % (верхняя граница ДИ)		26,36 (27,10)	43,57 (44,84)

Примечание: AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация время» в интервале времени от 0 до момента t отбора последней пробы крови; C_{max} – максимальная концентрация в крови; CV_{intra} – коэффициент внутрииндивидуальной вариабельности; CV_{pooled} – усредненное («пулированное») значение коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности; ДИ – доверительный интервал.

Note: AUC_{0-t} is the area under the curve «concentration time» in the time interval from 0 to the time t of the last blood sample; C_{max} – maximum concentration in the blood; CV_{intra} – coefficient of intraindividual variability; CV_{pooled} – averaged («pulled») value of the coefficient of intraindividual variability; CI – confidence interval.

Поэтому при планировании исследований биоэквивалентности следует руководствоваться Национальным стандартом ГОСТ Р 57679–2017 «Исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов» (пункт 2.10) и Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (пункты 105–110) [7–8]. А именно планировать исследования с повторным дизайном (с тремя или четырьмя периодами) и при оценке биоэквивалентности использовать подход с масштабированием границ, что также позволит оптимизировать размер выборки (количество субъектов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ретроспективный анализ результатов исследований биоэквивалентности телмисартана, показал высокую внутрииндивидуальную вариабельность параметра C_{max} .

Таким образом для препаратов телмисартана следует планировать исследования биоэквивалентности с повторным дизайном, то есть с тремя (неполный повторный дизайн) или четырьмя периодами (полный повторный дизайн), двумя перекрестами между периодами и двумя последовательностями приема препаратов.

В качестве препарата сравнения в исследованиях биоэквивалентности аторвастатина рекомендуется использовать препарат Микардис®, который является референтным согласно Государственному реестру лекарственных средств¹.

Длительность забора образцов крови должна быть не менее 72 ч, рекомендованный период отмывки – 7 суток. Можно рекомендовать следующий график отбора образцов крови – 0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5; 1.75; 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24; 36; 48; 72 ч.

Определять в плазме крови телмисартан рекомендуется аналитическим методом ВЭЖХ МС/МС. При этом метод должен позволять достичь адекватного НПКО, например 0,5–3 нг/мл.

Выбор дозировки для исследований биоэквивалентности: возможно изучение биоэквивалентности только одной дозировки изучаемого препарата, при условии идентичности технологии, места производства и пропорциональности составов между всеми дозировками, а также сопоставимости профилей растворения. Рекомендуется проведение исследования для максимально заявленной дозировки препарата 80 мг. При этом в протоколе следует учесть возможность развития ортостатических реакций на фоне снижения артериального давления. Для дополнительных дозровок необходим тест сравнительной кинетики растворения в сравнении с «биосерией» препарата.

Планировать размер выборки в исследование следует с учетом повторного дизайна исследования и возможностью масштабирования границ для параметра C_{max} . При расчете следует ориентироваться на верхнюю границу доверительного интервала усредненных значений коэффициента внутрииндивидуальной вариабельности около 45%. Например, в исследование с полным повторным дизайном достаточно будет включения 20 субъектов (предполагаемая точечная оценка 0,95, ошибка I рода 5%, ошибка II рода 20%, $CV_{intra} \approx 45\%$). В исследования следует включать субъектов обоего пола в равном соотношении, так как для телмисартана показаны половые различия в фармакокинетике, которые могут оказать влияние на результаты исследований биоэквивалентности.

Оценку результатов исследования следует проводить с учетом повторного дизайна исследования и масштабированием границ биоэквивалентности для параметра C_{max} согласно вышеуказанным руководствам [ГОСТ и ЕАЭС]. Границей признания биоэквивалентности для параметра AUC_{0-t} должна оставаться 80,00–125,00%, как и отношение геометрических средних для обоих параметров.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР ААА-А18-118021590049-0).

¹ https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=907ae3f0-04dd-423b-b9e9-ebce8e488ac9&t=.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимов М. Л., Дралова О. В. Блокатор рецепторов ангиотензина телмисартан: эффективность, безопасность и актуальность клинического применения. *Системные гипертензии*. 2017; 14(1): 51–57.
2. Borbás E., Nagy Z. K., Nagy B., Balogh A., Farkas B., Tsinman O., Tsinman K., Sinkó B. The effect of formulation additives on *in vitro* dissolution-absorption profile and *in vivo* bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2018; 114: 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.029>.
3. Pathak S. M., Aggarwal D., Venkateswarlu V. Establishment of *in vitro* – *in vivo* equivalence of highly variable drugs – a generic product development perspective. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2014; 19: 4, 401–410. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.788513>.
4. Chung I., Oh J., Lee S., Jang I. J., Lee Y., Chung J. Y. Retraction and Republication: A post hoc analysis of intra-subject coefficients of variation in pharmacokinetic measures to calculate optimal sample sizes for bioequivalence studies. *Transl Clin Pharmacol*. 2018; 26(1): 48–48. <https://doi.org/10.12793/tcp.2018.26.1.48>.
5. Яичков И. И., Ромодановский Д. П., Шитов Л. Н. Возможные причины получения неэквивалентных результатов исследований сравнительной фармакокинетики. *Медицинская этика*. 2018; 2: 48–57.
6. Ibarra M., Va'zquez M., Fagiolino P. Sex Effect on Average Bioequivalence. *Clin Ther*. 2017; 39: 23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.11.024>.
7. ГОСТ Р 57679-2017. Лекарственные средства для медицинского применения. Исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов. Введ. 2017-09-19. – М.: *Стандартинформ*. 2017: 30.
8. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Available at: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/0121136/ria_30062015_att.pdf (дата обращения 04.04.2019).

REFERENCES

1. Maximov M. L., Dralova O. V. Angiotensin receptor blocker telmisartan: efficacy, safety and relevance of clinical use. *Systemic hypertension*. 2017; 14(1): 51–57 (In Russ.).
2. Borbás E., Nagy Z. K., Nagy B., Balogh A., Farkas B., Tsinman O., Tsinman K., Sinkó B. The effect of formulation additives on *in vitro* dissolution-absorption profile and *in vivo* bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2018; 114: 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.029>.
3. Pathak S. M., Aggarwal D., Venkateswarlu V. Establishment of *in vitro* – *in vivo* equivalence of highly variable drugs – a generic product development perspective. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2014; 19: 4, 401–410. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.788513>.
4. Chung I., Oh J., Lee S., Jang I. J., Lee Y., Chung J. Y. Retraction and Republication: A post hoc analysis of intra-subject coefficients of variation in pharmacokinetic measures to calculate optimal sample sizes for bioequivalence studies. *Transl Clin Pharmacol*. 2018; 26(1): 48–48. <https://doi.org/10.12793/tcp.2018.26.1.48>.
5. Yachkov I. I., Romodanovsky D. P., Shitov L. N. Possible reasons for obtaining non-equivalent results from comparative pharmacokinetics. *Medical ethics*. 2018; 2: 48–57 (In Russ.).
6. Ibarra M., Va'zquez M., Fagiolino P. Sex Effect on Average Bioequivalence. *Clin Ther*. 2017; 39: 23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.11.024>.
7. GOST R 57679-2017. Medicines for medical use. Bioequivalence studies of drugs. Enter 2017-09-19. – M.: *Standartinform*. 2017: 30 (In Russ.).
8. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission dated November 3, 2016 № 85 «On approval of the Rules for conducting studies of bioequivalence of drugs within the framework of the Eurasian Economic Union». Available at: https://docs.eaeunion.org/ria/ru-ru/0121136/ria_30062015_att.pdf (accessed 04.04.2019).

ПАМЯТИ СЕРГЕЯ НИКОЛАЕВИЧА БЫКОВСКОГО



7 июня ушел из жизни один из самых одиозных деятелей фармрынка, основатель и бывший президент ГК «Фармконтракт» **Сергей Быковский**. Пожалуй, на нашем рынке нет того, кто бы не знал Сергея и не пересекался с ним по работе. Казалось, что этот человек успевает все и везде: на 90% российских заводов стоит оборудование, поставленное его холдингом, в ряде лабораторий применяются методики, разрабатываемые совместно со специалистами «Фармконтракта», он первый начал внедрять комплексный подход по созданию современных заводов, консолидировав услуги проектирования и строительства с поставкой и пусконаладкой технологического и лабораторного оборудования. Его сфера интересов не ограничивалась только бизнесом. «Ведя бизнес в России, ты должен вкладываться в развитие отечественной промышленности», – неоднократно подчеркивал **Сергей Быковский** в своих интервью. И это были не пустые слова. Он постоянно поддерживал и оказывал помощь воспитанникам детских домов в рамках созданного им проекта «Подарим детям веру в чудеса!», хотя и не любил об этом говорить. Им был запущен совершенно бесплатный для всех причастных к фармотрасли ВАКовский журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств». Позже он вдохнул новую струю жизни в журнал о надлежащих производственных практиках «Новости GMP», превратив его в международный бренд. Он вкладывался в развитие научного потенциала, поддерживая молодых ученых и помогая маститым профессорам выпускать научные труды, по которым учится не один фармацевтический/медицинский вуз. Приглашал и оплачивал пребывание лекторов с мировым именем для выступления в вузах, учреждал именные стипендии и организовывал научные конференции, которые мог посетить совершенно бесплатно любой желающий.

История звездного восхождения **Сергея Быковского** и стремительного покорения фармрынка его структурой могла бы стать русским аналогом фильма «Миллионер из трущоб». Он никогда не скрывал, что вырос в обычной, даже, напротив, подчеркивал, крестьянской семье, а свое покорение Москвы начинал, как и вся привлекаемая огнями столицы молодежь, с работы в ресторанном бизнесе. В 2010 году он попал на фармацевтический рынок, который уже не отпускал его до последнего. Пройдя путь от рядового менеджера по продажам, **Сергей Быковский** начал создавать свою дистрибьюторскую империю. В это время он любил повторять, что его поддержкой является Конституция Российской Федерации, а прибыль – всего лишь приятное следствие предпринимательской деятельности. Спустя 6 лет **Быковский** диверсифицировал свой бизнес, включив в спектр выполняемых созданной им империи работ инжиниринг и строительство. Не все было просто в карьере самого Сергея. Но он никогда не опускал рук. Ставя амбициозные и масштабные задачи, он всегда летел к их исполнению, работая целыми сутками, порой забывая про отдых.

Как и в любой империи, у «Фармконтракта» были взлеты и падения. И летом 2018 г. компания была продана. Однако ситуация с вынужденной продажей главного «ребенка» своей жизни не отпускала Сергея – он остро переживал ее, что, безусловно, сказывалось на здоровье, которое в последние месяцы его сильно подводило. По сообщениям близких, в последнее полгода Сергей перенес 2 операции, практически не занимался какими-то делами, пытаясь поправить ухудшающееся здоровье. Он редко жаловался и старался своими силами решить возникающие проблемы, как и всегда стремясь сделать все на высшем уровне и в невозможные для обычного человека сроки. Как это ни пафосно прозвучит, Сергей стремился изменить и сделать мир каждого, с кем его сводила судьба, ярче, легче и проще. К сожалению, он не все успел...

Редакция выражает соболезнования родным и близким, столкнувшимся с невосполнимой утратой.

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 науки:

- 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 выборки 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 не-

соответствия 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&PHPSID=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: Синдрол 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 Кангю 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.

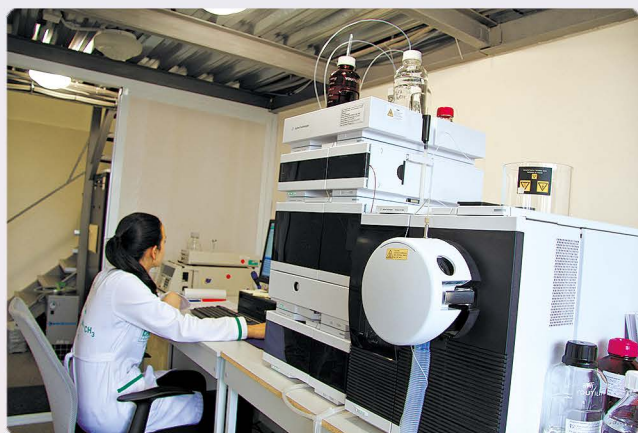
Каждый рисунок должен сопровождаться подписочной подписью на русском и английском языках. В подписочных подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подписочных 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.



Расписание обучающих мероприятий в Центре Фармацевтической Аналитики на период сентябрь-декабрь 2019 г.

№	Название курса	Даты проведения	Стоимость
1	Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств	10–11 октября	14 900 руб./слушатель
2	Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: базовый курс	24–25 октября	14 900 руб./слушатель
3	Разработка, валидация и применение хроматографических методик анализа в контроле качества ЛС: продвинутый курс	7–8 ноября	14 900 руб./слушатель
4	Исследования фармакокинетики и биоэквивалентности: надлежащая и ненадлежащая практика	28–29 ноября	14 900 руб./слушатель
5	СМК и GLP в исследовательских лабораториях: внедрение и реализация на практике	12–13 декабря	14 900 руб./слушатель

Скидки при заказе трех и более разных курсов: 30%.

Стоимость выездного семинара по любой из указанных тем у Вас на предприятии стоимость обучения составляет **99 000 руб./группа***.

Для участия в семинаре необходимо прислать в свободной форме заявку на адрес info@cpha.ru.

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



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».

Место проведения: г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2,
АО «Технопарк «Слава»

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 (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммуотоксическое 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