

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ISSN 2305-2066 (Print)
ISSN 2658-5049 (Online)

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ



ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II

Максимальная ежедневная эффективность
и надежность при выполнении любых задач

Семейство приборов **Agilent InfinityLab**,
колонки и расходные материалы легко
комбинируемые друг с другом
для оптимизации работы

**Agilent**

Trusted Answers



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 противоязвенных 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

2020. Том 9, № 1

RAZRABOTKA I REGISTRACIÂ LEKARSTVENNYH SREDSTV

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2020. Volume 9, No. 1

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 одобрения. **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

Аммури 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 ФГАУ РУДН, Москва, Россия

Ваизова О. Е., доцент, д.м.н., профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

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 ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

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

Каленикова Е. И., проф., д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, 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 ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

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

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

Мирошниченко И. И., д.м.н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), 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.н., 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 ФГАУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 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 «СРФА»), 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

Olga E. Vaizova, as. Prof., Dr. of Sci., Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Konstantin S. Guzev, Retinoidy 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

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State 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.), FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Igor I. Miroshnichenko, Dr. of Sci., Federal State Budget Scientific Institution «Scientific Center of Mental Health», 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

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

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

Сысцев Б. Б., доц., д.фарм.н., 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

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

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

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

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

Olga V. Trineeva, Dr. of Sci. (Pharm.), Voronezh State University, Voronezh, Russia

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

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

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 с 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

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. Kuldjanova

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	6	Introduction
Практические рекомендации	7	Practical recommendations
Мероприятия	10	Events
Раздел «Поиск и разработка новых лекарственных средств»		«Research and development of new drug products» part
А. Л. Молдавский, А. М. Юраков, Б. Ю. Лалаев, И. А. Фридман	13	Alexander L. Moldavsky, Andrei M. Yurakov, Boris Yu. Lalaev, Ilya A. Fridman
Новые подходы к совершенствованию микрореакторного синтеза бендамустина		New approaches to Improving Bendamustine Microreactor Synthesis
Раздел «Фармацевтическая технология»		«Pharmaceutical Technology» part
О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк, Д. Ю. Ивкин, И. А. Наркевич	18	Oksana A. Terenteva, Elena V. Flisyuk, Dmitry Yu. Ivkin, Igor A. Narkevich
Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента		Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design
О. А. Терентьева, В. А. Вайнштейн, Е. В. Флисюк, Ю. Э. Генералова	23	Oksana A. Terenteva, Viktor A. Vainshtein, Elena V. Flisyuk, Yuliya E. Generalova
Разработка таблеток, содержащих гигроскопичное активное вещество, с применением твердых дисперсий		Tablet Development for a Hygroscopic Drug Using Solid Dispersion
Раздел «Методы анализа лекарственных средств»		«Analytical Methods» part
Е. С. Мищенко, А. Д. Лазарян, Т. Т. Лихота	30	Ekaterina S. Mishchenko, Anush D. Lazaryan, Tat'yana T. Lihota
Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3h)-она, методом УФ-спектрофотометрии		Development of UV-spectrophotometry Method of the Quantitative Determination of a New Substance Quinazoline-4(3h)-on Derivate
С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл.), А. В. Беляцкая, О. И. Степанова, С. Р. Нарышкин	35	Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (jr.), Anastasia V. Belyatskaya, Olga I. Stepanova, S. R. Naryshkin
Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций		Evaluation of the Possibility of Using the Method of UV Spectrophotometry for the Development of Quantitative Determination of Naftifine Hydrochloride in its Solution with a Combination of PEG for the Treatment of Fungal Infections
О. В. Тринеева, А. А. Гудкова, М. А. Рудая	40	Olga V. Trineeva, Alevtina A. Gudkova, Margarita A. Rudaya
Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной		Application of Luminescent Microscopy in Analysis of Anatomic-diagnostic Signs of Fruits of Sea Buckthorn
В. А. Шелехова, К. Р. Савельева, С. В. Поляков, В. Н. Шестаков	46	Vera A. Shelekhova, Kristina R. Savelyeva, Sergei V. Polyakov, Vladislav N. Shestakov
Физико-химические свойства и методы контроля пантопразола натрия сесквигидрата (обзор) Физико-химические свойства и методы контроля пантопразола натрия сесквигидрата (обзор)		Physical and Chemical Properties and Methods of Control of Pantoprazol Sodium Sesquihydrate (Review)
А. А. Чапленко, О. В. Моногарова, К. В. Осолок	55	Alexander A. Chaplenko, Oksana V. Monogarova, Kirill V. Oskolok
Идентификация нестероидных противовоспалительных средств методом цифровой цветометрии с применением способа главных компонент		Digital Colorimetry of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Identification Using Principal Component Method
Н. О. Ким, Е. А. Ивановская	60	Nadezhda O. Kim, Elena A. Ivanovskaja
Валидация методики определения микропримесей ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии		Validation of Method for Mercury Impurities Determination in Protamine Sulfate by Stripping Voltammetry

Ю. И. Полтавец, С. В. Алешин, В. В. Заварзина, А. И. Муравьева, А. А. Соболева, И. А. Тубашева, С. Л. Кузнецов	66	Yury I. Poltavets, Sergey V. Aleshin, Vasilisa V. Zavarzina, Anna I. Murav'eva, Anastasia A. Soboleva, Irina A. Tubasheva, Sergey L. Kuznetsov
Образование посторонних примесей в полимерных частицах, содержащих доцетаксел, в процессе хранения и под действием гамма-облучения		Formation of Docetaxel-related Substances in the Polymer Particles During Storage and Gamma-treatment
Е. В. Успенская, И. В. Казымова, Т. В. Плетенева, Т. Е. Елизарова, А. В. Сыроешкин	75	Elena V. Uspenskaya, Ilaha V. Kazymova, Tatyana V. Pleteneva, Tatyana E. Elizarova, Anton V. Syroeshkin
Определение скорости растворения активных фармацевтических субстанций методом лазерной дифракции света		Determination of Active Pharmaceutical Substances Dissolution Rate by Laser Light Diffraction Method
Раздел «Доклинические и клинические исследования»		
А. И. Одноров, Т. В. Гребенникова, Т. В. Плетенева	83	Artem I. Odnorov, Tat'yana V. Grebennikova, Tat'yana V. Pleteneva
Специфическая терапия гриппа: современное состояние и перспективы (обзор)		Specific Influenza Therapy: Current State and Prospects (Review)
Е. Г. Кузнецова, О. М. Курылева, Л. А. Саломатина, В. И. Севастьянов	92	Evgeniya G. Kuznetsova, Olga M. Kuryleva, Lidia A. Salomatina, Viktor I. Sevastianov
Экспериментальное исследование диффузии иммуномодулятора Галавит® в модельной системе		Experimental Investigation of Immunomodulator Galavit® Diffusion in a Model System
Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, О. А. Мискив, Д. С. Богданова, А. В. Алешина, Ю. В. Медведев, Н. С. Багаева	99	Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin, Olga A. Miskiv, Dana S. Bogdanova, Alexandra V. Aleshina, Yuri V. Medvedev, Natalia S. Bagaeva
Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС		Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method
Раздел «Регуляторные вопросы»		
И. В. Шульгина, О. А. Лобовикова, О. А. Волох, О. В. Громова, А. К. Никифоров, А. В. Комиссаров, В. А. Демченко, А. С. Феськова, С. С. Галетова, Н. П. Миронова, В. И. Павлова	109	Irina V. Shulgina, Oxana A. Lobovikova, Oxana A. Voloh, Ol'ga V. Gromova, Alexey K. Nikiforov, Alexandr V. Komissarov, Victoria A. Demchenko, Anna S. Fes'kova, Svetlana S. Galetova, Natalya P. Mironova, Varvara I. Pavlova
Обзор пострегистрационных изменений в процессе жизненного цикла вакцины холерной бивалентной химической (обзор)		Review of Post-registration Changes in the Life Cycle of Cholera Bivalent Chemical Vaccine (Review)
Рецензия на книгу		
	115	Book Review

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ, КОЛЛЕГИ, ПАРТНЕРЫ!

Вы держите в руках первое в 2020 году издание научно-производственного журнала «*Разработка и регистрация лекарственных средств*». Прежде, чем Вы приступите к изучению статей журнала, хочется поделиться с Вами теми изменениями, которые произошли с нашим изданием за прошедший год.

А начать хотелось бы с новости о подаче заявки на включение издания в международную базу данных SCOPUS. Для нас это международная известность, а для Вас – повышение научной значимости издания. Безусловно, это повлечет за собой и изменение требований к оформлению статей, однако мы рассчитываем, что совместными усилиями нам удастся повысить общий уровень публикаций и выйти на международный уровень.

Коллектив журнала ведет активную работу по развитию как печатного журнала, так и web-ресурса «*Разработка и регистрация лекарственных средств*». С недавних пор мы запустили новостной блок для специалистов фармацевтической отрасли, где публикуется информация о наиболее интересных новостях и мероприятиях. Для вашего оперативного доступа к актуальной информации мы осуществляем регулярные рассылки для наших подписчиков, также после выхода нового издания журнала наши подписчики получают электронную версию журнала БЕСПЛАТНО. Подписаться на рассылку можно тут:



Печатный журнал Вы также можете бесплатно получить на одном из мероприятий фармацевтической отрасли.

А специально для тех, кому комфортнее получать информацию с экрана мобильного телефона, мы публикуем новости, анонсы статей, а также мероприятий фармацевтической отрасли в социальных сетях журнала «*Разработка и регистрация лекарственных средств*». Приглашаем в гости на нашу страничку в Facebook @pharmjournal.ru, ставьте «нравится» и вся публикуемая нами информация будет отображаться в Вашей ленте новостей.



Помимо публицистической деятельности, мы регулярно проводим научно-практические конференции, где стараемся освещать, обсуждать наиболее интересные и актуальные вопросы фармацевтической отрасли. Информацию о ближайших мероприятиях мы публикуем на нашем сайте, в социальных сетях, а также информируем Вас по электронной почте.

Последнее и самое важное – хочется сказать СПАСИБО нашим партнерам, которые за время совместной работы стали нашими друзьями. Друзья, именно благодаря вашей поддержке мы есть и продолжаем развиваться. В этом году к нам присоединились известные всему лабораторному сообществу компании **Agilent Technologies** и **ХИММЕД**. Желаем всем нам продуктивной работы и эффективного сотрудничества.

Подробнее о партнерских возможностях см. стр. 9.

С уважением, редакция



ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ АВТОСАМПЛЕРА ВЭЖХ

Материал предоставлен
компанией Agilent Technologies

Хотите улучшить работу своей системы ВЭЖХ? Мы хотим поделиться с вами советами и подсказками о поиске и устранении неисправностей автосамплера ВЭЖХ.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ АВТОСАМПЛЕРА ВЭЖХ

Система ВЭЖХ позволяет легко и быстро выполнять разделение с высоким разрешением. В типичную систему входит насос, детектор и автосамплер. В этой статье мы рассмотрим оптимизацию работы системы ВЭЖХ, а именно – ее автосамплера.

В ВЭЖХ автосамплер применяется для увеличения пробопотока, увеличения точности ввода и для того, чтобы обеспечить работу системы в автоматическом режиме. Основными элементами автосамплера являются игла или шприц, мерник для отмеривания нужного объема пробы и петля ввода пробы. Для переключения гидравлического тракта растворителя применяется клапан.

Как это бывает с большинством лабораторного оборудования, иногда автосамплер просто не желает работать без проблем, и приходится искать способы его наладить. неполадки в работе системы могут возникать по одной из или всех вместе нижеперечисленных проблем.



Механические проблемы

Для бесперебойной работы автосамплера надо поддерживать в чистоте и периодически проверять его регулировки.

Природа образца и его местоположение в лотке

Неправильная идентификация образцов может потенциально привести к серьезным последствиям.

Эффект памяти

Проявляется в том, что на хроматограмме проявляются слабые пики предыдущего образца. Чаще всего это происходит из-за адсорбции аналитов на поверхностях инжектора.

ЧАСТЫЕ ПРОБЛЕМЫ С ЗАГРЯЗНЕНИЕМ

1. **Эффект памяти.** Обычно является результатом адсорбции определяемых веществ и соединений матрицы на металлических и пластиковых поверхностях автосамплера.
 - ✓ Изношенные детали с повреждениями или шероховатой поверхностью увеличивают эффект памяти, так как хорошо адсорбируют компоненты матрицы. Например, трение наружной поверхности иглы о внутреннюю поверхность седла иглы.
 - ✓ Эффект памяти может также возникать из-за нерегулярно заменяемого растворителя для промывки иглы.
2. **Загрязнения системы, на которое могут указывать ложные пики.** Как правило, они указывают на позднее элюирование соединений предыдущей пробы, а не на загрязнение автосамплера. Уширенные пи-

- ки можно разделить, применив более эффективную очистку пробы.
3. **Загрязнение пробы.** На загрязнение пробы обычно указывают узкие ложные пики. Загрязнения могут попасть в пробу из различных источников и на различных этапах пробоподготовки. Чтобы избежать этого, пробоподготовку следует осуществлять вдали от источников загрязнений и использовать только чистые виалы.
 4. **Игла для отбора проб.** Если она засорилась – замочите ее в подходящем растворителе, однако не забывайте – сварные иглы нельзя подвергать ультразвуковой чистке. (Как правило прочистить засоренную иглу очень сложно, лучше всего заменить ее).
 5. **Виалы.** Чтобы избежать кавитации, не наполняйте виалы до верха, а также убедитесь в том, что материал виалы и септы подходят для пробы.
- ✓ В зависимости от вязкости образца может понадобиться отрегулировать скорость забора пробы.
 - ✓ Также нельзя забывать о том, что летучие компоненты пробы и растворителя могут испаряться из виалы после того, как септа будет пробита.
 - ✓ Виалы и колпачки должны подходить друг другу. В противном случае с виалами будет сложно работать, и они даже могут выпадать из захвата. Например, низкокачественные колпачки могут привести к тому, что игла или седло иглы будет забиваться частицами септы.

СОВЕТЫ ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ ОБСЛУЖИВАНИЮ

Регулярное техническое обслуживание может помочь в поиске и устранении неисправностей автосамплера ВЭЖХ. Техническое обслуживание следует выполнять не реже одного раза в год. Что следует принимать во внимание.

- ✓ **Иглы и седла иглы.** Думайте про них, как про одну деталь, и заменяйте одновременно. Поврежденная наружная поверхность иглы может повредить седло, и наоборот.
- ✓ **Капилляр петли.** Так как он не подвержен износу и регулярно промывается, на него обычно не обращают внимание в ходе профилактического обслуживания. Однако про него следует помнить в ходе поиска утечек или источника загрязнения.
- ✓ **Уплотнение ротора крана-дозатора.** Не забывайте осматривать наружную поверхность статора на предмет повреждений, так как они могут ускорить износ уплотнения и привести к еще большему числу повреждений. Механические повреждения ротору обычно наносят нерастворенные кристаллики буфера или эксплуатация в неподходящем диапазоне значений pH.
- ✓ **Уплотнение мерника** (можно обслуживать каждые два года).

- ✓ **Перед сменой методики вся система должна быть тщательно промыта.** Это особенно важно при работе с буферными растворами высокой концентрации, так как нерастворившиеся кристаллики солей приводят к механическому износу частей хроматографического тракта.

- ✓ **Не забывайте проверять патрубок для слива конденсата охлаждаемых автосамплеров.** Конденсат должен беспрепятственно стекать в отходы.

Чтобы обеспечить постоянную оптимизацию системы ВЭЖХ очень важно предвидеть любые проблемы, которые могут возникнуть с автосамплером. Сохраните закладку на эту статью, чтобы воспользоваться ею, когда будете обслуживать автосамплеры ВЭЖХ, и не забывайте возвращаться за другими полезными статьями.

Решения Agilent InfinityLab для высокоэффективной и ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии включают в себя приборы, колонки и расходные материалы, которые помогают лаборатории работать с максимальной эффективностью. Узнайте больше, посетив наш веб-сайт: <https://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography>



НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ



Медиа-партнерство



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

В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

➤ Публикации в печатном и электронном журнале

- Научные статьи
- Рекламные статьи
- Рекламные модули

➤ Баннерная реклама на сайте

Размещение рекламных баннеров на сайте
pharmjournal.ru

➤ Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала

➤ e-mail маркетинг (в базе 16500 адресов)

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



О журнале

Разделы издания охватывают весь жизненный цикл лекарственного средства:

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



Включен в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.
Редакция ведет работу по включению журнала в список цитирования SCOPUS.

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



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

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

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПО ПРАВИЛАМ ЕАЭС»

Международная научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов по правилам ЕАЭС» прошла в Москве 6 декабря. Организаторами конференции выступили Центр Фармацевтической Аналитики (ЦФА) и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств», со-организаторами – компании ERWEKA, «Химмед» и Gluvex.



Конференция традиционно была открыта директором научно-производственного журнала **Натальей Кульджановой**. Директор журнала рассказала слушателям о произошедших в издании изменениях, а также поделилась планами о дальнейшем развитии журнала. Стоит отметить, что издание планирует расширить область своего присутствия и в ближайшем будущем выйти на международную арену.

Партнеры научно-производственного журнала – **компания «Химмед»** поделились со слушателями информацией о своих эксклюзивных продуктах – *высокоочищенных растворителях собственного производства для производственных и аналитических целей*.

В своем докладе специалист по продукции собственного производства **Светлана Коновалова** рассказала слушателям об эксклюзивных продуктах компании «Химмед» – ацетонитрил, метанол и изоктан высших квалификаций для хроматографии и УФ-спектроскопии. Компания «Химмед» разработала собственную технологию производства, которая позволяет получать продукт с характеристиками, соответствующими международным общепринятым стандартам, а в ряде случаев превосходящими зарубежные аналоги, по более приятной для потребителя цене. Российское производство является и гарантом сокращения сроков поставки. Продукт фильтруется через 0,2 мкм фильтр и упаковывается в атмосфере инертного газа (аргона). Что важно, попадание приме-

сей в готовый продукт исключено, благодаря отработанной технологии подготовки тары. С потребителя полностью снимается вопрос утилизации использованной тары, благодаря тому, что компания «Химмед» принимает обратно тару из-под своих растворителей. Предприятие сертифицировано и работает по международной системе менеджмента качества ГОСТ ISO 9001. Вся продукция проходит контроль в собственной производственной лаборатории, которая соответствует МИ 2427-2016 «Оценка состояния измерений в испытательных лабораториях». Лаборатория аттестована и имеет свидетельство № 07-57 об оценке состояния измерений. Продукт соответствует Российской и Европейской фармакопее.

Научная программа конференции состояла из трёх секций: **GMP-секция, GCP-секция и GLP-секция**. Производственная секция конференции была представлена докладами **Игоря Шохина** «Опыт исследований СТКР в практической деятельности ООО «ЦФА». Что произошло нового за последний год?», **Ильи Петрова (ERWEKA)** «Оборудование для теста «Растворение» с учетом норм современных фармакопей. Обеспечение целостности данных» и **Татьяны Родиной (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)** «ВЭЖХ-МС/МС в разработке пептидных препаратов: от простого к сложному. Идентификация родственных примесей».

В рамках данной тематики генеральный директор ООО «ЦФА», д.фарм.н. **Игорь Шохин** представил доклад: «Опыт исследований СТКР в практической



деятельности ООО «ЦФА». Что произошло нового за последний год?». В докладе была отмечена необходимость проведения не только базового теста сравнительной кинетики растворения согласно действующим руководствам, но и теста в биорелевантных средах – наиболее информативного инструмента при разработке малорастворимых лекарственных средств. Кроме того, была подчеркнута необходимость применения современных статистических методов (например, T^2 -тест) для оценки эквивалентности профилей растворения в том случае, если не выполняются критерии применимости фактора сходимости f_2 .

Пример краткого статистического отчета по сравнению профилей растворения методом T^2 -тест:

```
R Console
Page 1

***** The T2-test for equivalence *****
***** Variant for comparing highly variable dissolution profiles *****
***** ( see Hoffelder (2016) ) *****

Summary statistics:
Sample size of REF sample: 6
Sample size of TEST sample: 12
Sample size of pooled sample: 18
Dimension (Nr. of time points): 5
REF Mean: 25.92325 26.38147 26.32657 25.86159 25.22779
TEST Mean: 13.47139 16.28867 17.08335 16.59617 15.98144
Empirical REF covariance matrix: 17.58 11.82 13.83 11.74 18.29 11.82 12.58 10.4 6.1 12
.65 13.83 10.4 13.86 5.75 13.35 11.74 6.1 5.75 14.64 14.61 10.29 12.65 13.35 14.61 22.26
Empirical TEST covariance matrix: 1.19 0.41 -0.55 0.52 -0.15 0.41 0.2 -0.02 0.23 -0.05
-0.55 -0.02 0.89 -0.03 0.06 0.52 0.23 -0.03 0.36 -0.11 -0.15 -0.05 0.06 -0.11 0.29
Pooled empirical covariance matrix: 9.38 6.12 6.64 6.13 9.07 6.12 6.39 5.19 3.16 6.3 6.64
5.19 7.37 2.86 6.71 6.13 3.16 2.86 7.5 7.25 9.07 6.3 6.71 7.25 11.28
Estimated Mahalanobis distance: 30.00995
Equivalence margin: 36.7151
Hotelling's T2: 90.02984
Noncentrality parameter: 110.1453
Significance level: 0.05
Test statistic: 10.80358
Quantile of noncent. F-distribution: 10.18699
Decision in favor (1) or against (0) equivalence/similarity of dissolution profiles: 0

Test result:
p-value of the T2-test for equivalence: p = 0.06327268
Equivalence comparison not successful
```

Секция, посвященная надлежащей клинической практике, была представлена следующими докладами: **Татьяны Шериной (ЛАБМГМУ)** «Клинический этап исследований биоэквивалентности по нормам ЕАЭС», **Дмитрия Залеских (GluveX)** «USP 4 «проточная ячейка» для отдельных лекарственных форм. Исследования

биоэквивалентности и разработка метода», **Игоря Шохина (ЦФА)** «Взаимодействие аналитического центра с клиникой, CRO, спонсором при организации исследования КИ/БЭ: как обеспечить эффективную совместную работу?».

Доклад **Татьяны Шериной (ЛАБМГМУ)** был посвящен планированию этапа клинического исследования биоэквивалентности согласно требованиям ЕАЭС. Были рассмотрены основные аспекты действующего руководства – Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Кроме того, докладчик отметил некоторые замечания регулятора, возникающие при экспертизе отчетов об исследовании биоэквивалентности.

В рамках данной секции свой доклад также представил генеральный директор компании GluveX – **Дмитрий Залеских** на тему «USP 4 «проточная ячейка» для отдельных лекарственных форм. Исследование биоэквивалентности и разработка метода». Специалисты GluveX наглядно продемонстрировали работу тестера растворения Sotax AT Xtend и ответили на интересующие вопросы.

В докладе **Игоря Шохина** «Взаимодействие аналитического центра с клиникой, CRO, спонсором при организации исследования КИ/БЭ: как обеспечить эффективную совместную работу?» были рассмотрены основные моменты, которые может обеспечить аналитическая лаборатория на всех этапах проведения исследования биоэквивалентности:

- ✓ Текст методики в протокол и синопсис, включая целевой аналит (или аналиты).
- ✓ Условия для преаналитического этапа исследования.
- ✓ Фармакокинетические параметры и точки отбора.



Дмитрий Залеских

- ✓ Программное обеспечение для статистической обработки.
- ✓ СТКР, выбор биосерии, включая биорелевантные среды растворения, количественное определение.
- ✓ Лабораторный мануал для клинического центра и лабораторные киты, если есть необходимость.
- ✓ Отчетные материалы: план исследования, отчет о валидации, аналитический отчет, фармакокинетический отчет с приложениями, хроматограммы, архивные материалы.

Завершала серию докладов секция, посвященная надлежащей лабораторной практике, в которой были представлены доклады **Тимофея Комарова (ЦФА)** «Опыт применения ВЭЖХ-МС в практической деятельности ООО «ЦФА» и **Василия Казей (Экзактэ Лабс)** «К вопросу об обеспечении прозрачности и контроля КИ/БЭ дженериков».

Докладчики затронули довольно болезненную тему, посвященную прозрачности и контролю анали-

Временная точка	Препарат Т, нг/мл	Препарат R, нг/мл
0	0,00	0,00
1	58,14	59,45
2	656,22	654,57
3	720,51	723,14
4	703,42	703,99 - совпадение? Не думаю!
5	678,96	677,09
6	603,19	601,29
7	529,72	534,34

Для данного добровольца, вероятно, реально отобран в клинике только один этап исследования (препарат R), при этом плазма крови была разлита на две пробирки (первого и второго периода исследования)

тического этапа исследований. Так, было отмечено, что биоаналитическая часть исследований биоэквивалентности, в отличие от клинической, не инспектируется государственными органами (проводится только экспертиза отчетных материалов). Кроме того, были приведены примеры недобросовестного отношения спонсоров и контрактно-исследовательских организаций к проведению исследования биоэквивалентности:

- ✓ Отмечены случаи, когда проводится по факту ОДИН этап исследования (препарат R), при этом плазма крови разливается на 2 пробирки и выдается за оба этапа.
- ✓ Иногда препарат R дают добровольцам на обоих этапах исследования, заменяя им препарат Т.

Тимофеем Комаровым были отмечены основные принципы выполнения аналитического этапа в ООО «ЦФА», призванные повысить качество исследования биоэквивалентности в целом:

- ✓ Грамотный подбор условий пробоподготовки, хроматографического разделения и детектирования – научно обоснованный, но творческий процесс.
- ✓ Проведение валидации – стандарты FDA и ЕАЭС.
- ✓ Оценка влияния гемолиза, гиперлипидемии – связь с клиническим этапом.
- ✓ Оценка специфичности в ходе всего аналитического этапа.
- ✓ От начала исследования и до сдачи отчёта аналитик всегда «держит руку на пульсе».



Гемолизные образцы плазмы крови добровольцев потенциально могут привести к недостоверным результатам исследования

По завершении основной программы конференции всех слушателей ждал фуршет и свободное общение с коллегами. Слушатели и партнеры отметили высокую практическую значимость полученной информации, а также выразили желание посещать подобные мероприятия в дальнейшем. Всего мероприятие посетили более 80 слушателей из крупнейших фармацевтических компаний, научно-исследовательских институтов, а также ВУЗов.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-13-17>
УДК 615.014



Оригинальная статья/Research article

Новые подходы к совершенствованию микрореакторного синтеза бендамустина

А. Л. Молдавский^{1*}, А. М. Юраков¹, Б. Ю. Лалаев¹, И. А. Фридман¹

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

*Контактное лицо: Молдавский Александр Л. E-mail: amoldavski@pharmstd.ru

Статья получена: 09.01.2019. Статья принята к печати: 10.02.2020

Резюме

Введение. Реакция хлорирования в синтезе фармацевтической субстанции бендамустина гидрохлорида является сложным технологическим процессом. Наличие побочных реакций и образующиеся при этом примеси затрудняют процессы масштабирования [1–4].

Цель. Совершенствование процесса хлорирования в микрореакторном синтезе бендамустина для повышения производительности технологии.

Материалы и методы. Проведена серия экспериментов по совершенствованию технологии хлорирования в синтезе бендамустина гидрохлорида в проточном микрореакторе с различными концентрациями реагентов.

Результаты и обсуждение. Повышение концентрации исходных реагентов в реакционной массе позволило увеличить производительность технологии получения этилового эфира бендамустина (этиловый эфир 4-{5-[бис(2-гидроксиэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил}бутановой кислоты). Оптимизированы условия реакции хлорирования в синтезе бендамустина гидрохлорида, проанализированы возможные пути дальнейшего увеличения производительности. Изучено влияние изменения концентрации реагентов в исходных растворах и скоростей потоков растворов реагентов на конечный продукт реакции.

Заключение. Определены оптимальные концентрации реагентов в исходных растворах, позволяющие достичь производительности проточного микрореактора объемом 137 мл, которая эквивалентна производительности емкостного реактора объемом 100 л.

Ключевые слова: бендамустин, бендамустина гидрохлорид, хлорирование, проточный микрореактор.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. Л. Молдавский, А. М. Юраков разработали и оптимизировали технологию хлорирования в проточном микрореакторе. Б. Ю. Лалаев и И. А. Фридман проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Для цитирования: Молдавский А. Л., Юраков А. М., Лалаев Б. Ю., Фридман И. А. Новые подходы к совершенствованию микрореакторного синтеза бендамустина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 13–17.

New approaches to Improving Bendamustine Microractor Synthesis

Alexander L. Moldavsky^{1*}, Andrei M. Yurakov¹, Boris Yu. Lalaev¹, Ilya A. Fridman¹

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

*Corresponding author: Alexander L. Moldavsky. E-mail: amoldavski@pharmstd.ru

Received: 09.01.2019. Accepted: 10.02.2020

Abstract

Introduction. The chlorination reaction in the synthesis of the substance of bendamustine hydrochloride is a complex process. The presence of active adverse reactions makes scaling difficult.

Aim. Improving the performance of the technology for producing bendamustine ethyl ester in a flow microreactor.

Materials and methods. A series of experiments was carried out to carry out the chlorination stage in the synthesis of bendamustine hydrochloride in a flow microreactor with various concentrations in the initial reagent solutions.

Results and discussion. Experimental work was carried out to increase the productivity of the technology for the preparation of bendamustine ethyl ester (4-{[5-[bis(2-chloroethyl)amino]-1-methylbenzimidazol-2-yl]butanoic acid ethyl ester) by increasing the concentration of the starting reagents in the reaction mass. The conditions for conducting the chlorination reaction in the synthesis of bendamustine hydrochloride have been optimized, and possible ways to further increase productivity have been analyzed. The effect of changes in the concentration of reagents in the initial solutions and flow rates of reagent solutions on the final reaction product was studied.

Conclusion. The optimal concentrations of reagents in the initial solutions were selected, allowing to increase the productivity of the flow microreactor with a volume of 137 mL to an equivalent level of a 100 liter capacitive reactor.

Keywords: bendamustine, bendamustine hydrochloride, chlorination, flow microreactor.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Alexander L. Moldavsky, Andrei M. Yurakov developed and optimized the methodology for carrying out the chlorination stage in a flow microreactor. Boris Yu. Lalaev, Ilya A. Fridman interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Moldavsky A. L., Yurakov A. M., Lalaev B. Yu., Fridman I. A. New approaches to improving bendamustine microractor synthesis. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 13–17.

ВВЕДЕНИЕ

Реакция хлорирования в синтезе фармацевтической субстанции бендамустина гидрохлорида является сложным технологическим процессом. Наличие побочных реакций и образующиеся при этом примеси, затрудняют процесс масштабирования.

В настоящий момент известны технологии с использованием ограниченных количеств исходных соединений, не позволяющие получать количества продукта реакции, сопоставимые с промышленными сериями [1–4].

Ранее нами была разработана технология хлорирования в синтезе бендамустина гидрохлорида в проточном микрореакторе [5]. В качестве хлорирующего реагента использовался тионилхлорид (рисунок 1).

В результате побочных процессов образуются примеси (A, B, C, D) (рисунок 2).

Ранее изучены возможности использования скоростей потока более 40 мл/мин. При подаче реагентов до 40 мл/мин не наблюдается существенных изменений. Увеличение скорости до 60 мл/мин приводит к неполной конверсии промежуточного монохлорпроизводного [5].

Ранее, в технологии хлорирования диола(I) нами были использованы разбавленные растворы реагентов [5]. Массовое соотношение исходного диола(I) (этиловый эфир 4-[[5-бис(2-гидроксоэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановой кислоты) и растворителя в реакционной массе составляло 1:19,2 [5]. При таком соотношении растворы реагентов сохраняют гидравлические характеристики близкие к чистому растворителю.

Согласно описанной технологии, реакционную массу упаривали в вакууме, упаренный остаток растворяли в дихлорметане (DCM) и нейтрализовывали триэтиламином. Полученную смесь фильтровали, маточный раствор упаривали в вакууме досуха. Полученный сухой остаток сырья этилового эфира бендамустина перекристаллизовывали в системе гексан: этилацетат 3:2 [5].

Целью работы являлось совершенствование процесса хлорирования в микрореакторе синтезе бендамустина для повышения производительности технологии этилового эфира бендамустина(II), разработанной авторами ранее [5].

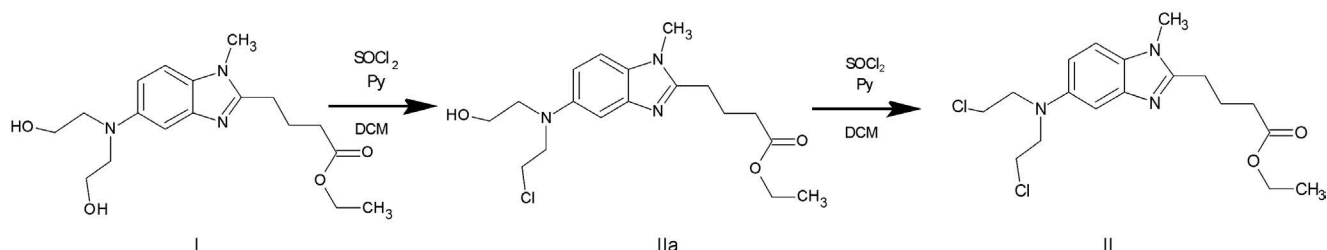


Рисунок 1. Схема хлорирования в синтезе бендамустина гидрохлорида

Figure 1. Scheme of the chlorination in bendamustine hydrochloride synthesis

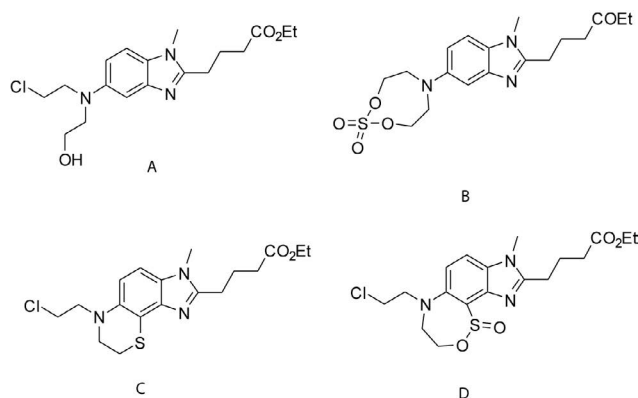


Рисунок 2. Примеси, образующиеся в реакции хлорирования диола(I)

Figure 2. Impurities formed in the chlorination reaction of diol(I)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные реактивы:

Этиловый эфир 4-[[5-бис(2-гидроксоэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановой кислоты, содержание основного вещества не менее 98,0 %.

Тионилхлорид (SOCl_2), содержание основного вещества не менее 99,5 %.

Триэтиламин (TEA), содержание основного вещества не менее 99,5 %.

Дихлорметан (DCM), extra dry (для анализа).

Этилацетат, х.ч.

Гексан, х.ч.

Ацетонитрил (для анализа).

Метанол (для анализа).

Трифторуксусная кислота (ТФУ) (для анализа).

Анализ ВЭЖХ проводился на хроматографе Agilent 1260 на колонке Zorbax SB-C18 5 мкм с обращённой фазой. Матричный детектор Waters 2695 Alliance. Температура образца 5 °С. Температура колонки 30 °С. Количественное определение основного компонента и примесей проводили по методу внутренней нормализации. Подвижная фаза А: 0,1 % ТФУ; H_2O . Подвижная фаза В: 0,1 % ТФУ; 50 % ацетонитрил: 50 % H_2O . УФ: 230 нм. Концентрация образца 0,25 мг/мл в метаноле. Объём впрыскивания – 10 мкл.

Градиент – 20 % в течение 1 мин; 20–90 % в течение 23 мин; 90 % в течение 4 мин.

Экспериментальная работа по оптимизации условий проведения реакции хлорирования проводилась в опытно-промышленной установке (рисунок 3), основной частью, которой являлся проточный микрореактор CORNING G1.

Эксперимент П.1

Раствор № 1

В плоскодонную колбу, снабжённую магнитной мешалкой, загружали 100 г диола(I) (этилового эфира 4-{5-[бис(2-гидроксиэтил)амино-1-метилбензидазол-2-ил]бутановой кислоты} (0,293 моль), добавляли 700 мл DCM, перемешивали до полного растворения, переносили в мерный цилиндр и доводили DCM до объёма 960 мл. Полученный раствор вновь переносили в колбу и тщательно перемешивали.

Раствор № 2

В мерный цилиндр загружали 73,14 г (0,641 моль; 1,05 eq) тионилхлорида и доводили до 960 мл DCM. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке.

После проверки чистоты и целостности реактора включали электропитание его основных узлов: термостатов, датчиков температуры, давления, дозирующих насосов.

На панели управления каждого дозирующего насоса устанавливали необходимый объёмный расход в мл/мин (см. таблицу 2).

На панели термостата № 1 устанавливали значение температуры 103,2 °С.

На панели термостата № 2 устанавливали значение 10 °С.

После установки параметров на насосах и термостатах входные трубки насосов погружали в чистый DCM. Выходную трубку реактора помещали в сборник органических сливов. Далее насосы и термостаты переводили из режима ожидания в рабочий режим. Параллельно с нагреванием реакционной зоны увеличивали давление в системе с помощью регулирующего вентиля до 7 бар.

После выхода установки на стабильный режим работы дозирующие насосы одновременно переводили на растворы реагентов.

С момента перевода насосов на перекачку реагентов давали отсчёт времени по секундомеру. Через время, равное значению $Rt \cdot 3$ (время выхода реактора на стационарный режим течения) (таблица 1), выходной поток из реактора направляли в сборник реакционной массы.

Реакционную массу упаривали в вакууме, затем растворяли в 320 мл DCM, полученный раствор нейтрализовали раствором 68,11 г (0,674 моль) 1,04 eq триэтиламина в 260 мл гексана. Выпавший осадок фильтровали и промывали трижды 100 мл этилацетата. Маточный раствор досуха упаривали в вакууме. Полученный сырец этилового эфира бендамустина(II) перекристаллизовывали в системе гексан – этилацетат 2:1. Перекристаллизованный этиловый эфир бендамустина(II) отфильтровывали и сушили в вакууме до постоянной массы.

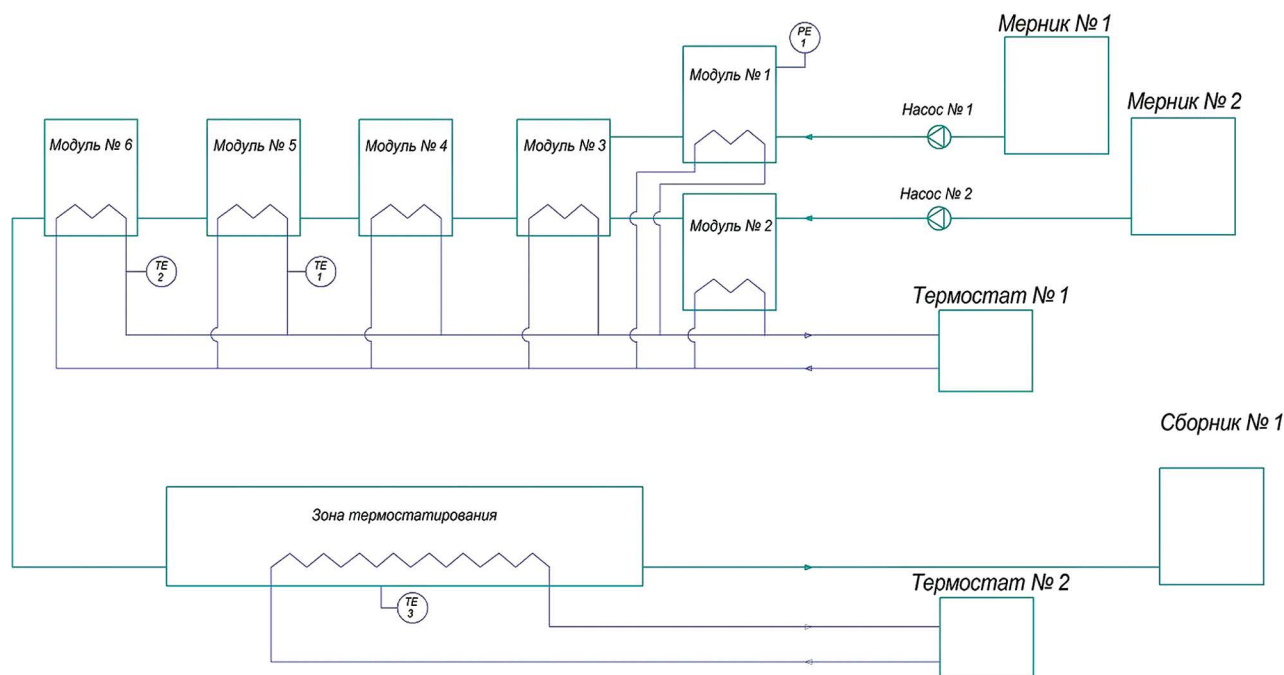


Рисунок 3. Схема опытно-промышленной установки проточного микрореактора CORNING G1

Figure 3. Scheme of the pilot industrial installation of the flowing microreactor CORNING G1

Таблица 1. Условия хлорирования диола(II) в микрореакторе CORNING G1

Table 1. The conditions of diole(II) chlorination in micrereactor CORNING G1

№	T, °C	FR _{общ.} (общая скорость потока реакционной массы), мл/мин	P, бар	Избыток SOCl ₂ , моль eq	RT*З
П.1.	100	40	7–8	1,05	10 мин 18 с

Образцы осадка этилового эфира бендамустина(II) анализировали методом ВЭЖХ.

Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты экспериментов по повышению концентрации реагентов в реакционной массе

Table 2. The results of experiments to increase the concentration of reagents in the reaction mass

№ эксперимента	Соотношение массы диола I к общему объёму растворителя	Концентрация диола(II) в реакционной массе, г/л	Содержание полупродукта (IIa), %	Содержание продукта реакции (II), %	Сумма примесей (A-C), %	Общее содержание примесей, %	Выход, %
П.1.	1:19,2	50	0,23	97,87	0,18	2,13	80–90
П.2.	1:12	80	0,00	97,26	0,55	2,73	79–88
П.3.	1:9	110	0,00	98,04	0,25	1,96	82–90

Чистота конечного продукта после выделения составляла 97,87 %.

Выход составлял 80–90 %

Эксперимент П.2

Раствор № 1

В плоскодонную колбу, снабжённую магнитной мешалкой, загружали 100 г диола(II) (этилового эфира 4-{5-[бис(2-гидроксиэтил)амино-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановой кислоты} (0,293 моль), добавляли 450 мл DCM, перемешивали до полного растворения, переносили в мерный цилиндр и доводили DCM до объёма 600 мл. Полученный раствор вновь переносили в колбу и тщательно перемешивали.

Раствор № 2

В мерный цилиндр загружали 73,14 г (0,641 моль; 1,05 eq) тионилхлорида и доводили до 600 мл DCM. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке.

Алгоритм проведения эксперимента П.3 идентичен ходу эксперимента П.1.

Выделение продукта проводили по методике аналогичной эксперименту П.1.

Результаты анализа см. в таблице 2.

Чистота конечного продукта после выделения составляла 97,26 %.

Выход составлял 79–88 %

Эксперимент П.3

Раствор № 1

В плоскодонную колбу, снабжённую магнитной мешалкой, загружали 100 г диола(II) (этилового эфира 4-{5-[бис(2-гидроксиэтил)амино-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановой кислоты} (0,293 моль), добавляли 300 мл DCM, перемешивали до полного растворения, переносили в мерный цилиндр и доводили DCM до объёма 450 мл. Полученный раствор вновь переносили в колбу и тщательно перемешивали.

Раствор № 2

В мерный цилиндр загружали 73,14 г (0,641 моль; 1,05 eq) тионилхлорида, доводили до 450 мл DCM. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке.

Алгоритм проведения эксперимента П.3 идентичен ходу эксперимента П.1.

Обработка реакционной массы и выделение этилового эфира бендамустина проходила аналогично эксперименту П.1.

Результаты анализа представлены в таблице 2.

Чистота конечного продукта после выделения составляет 98,04 %.

Выход составляет 82–90 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам экспериментальных опытов П.2 и П.3 был получен продукт реакции с высоким выходом, соответствующим уровню значений ранее проведенных экспериментов с более разбавленными растворами. При этом количество примесей в продукте реакции не возросло, что позволяет использовать полученный полупродукт II синтеза бендамустина гидрохлорида на следующих стадиях производства активной фармацевтической субстанции бендамустина гидрохлорид.

В результате концентрирования растворов удалось повысить производительность метода более чем в 2 раза.

Для сравнения, наиболее продуктивная методика, известная из литературы, описана для загрузки 1,15 моль диола(II). Время реакции составляет 6 часов [6]. При условии 100 % конверсии и выхода, данная схема позволяет получить не более 486 г хлорированного полупродукта синтеза бендамустина.

За аналогичное время реакции (6 часов) через проточный реактор проходит 14,4 л реакционной массы, что с учётом выхода на стадии не менее 82 %

позволяет получить 4,48 кг этилового эфира бендамустина, что более чем в 9 раз превышает массу продукта, полученную с использованием емкостного оборудования.

Дальнейшее увеличение производительности процесса за счёт повышения концентраций реагентов возможно, но ограничено растворимостью исходного диола(I) в DCM при температурах не выше 25 °С, растворимостью продукта реакции и всех компонентов реакционной массы при температурах не выше 10 °С, а также увеличением вязкости раствора исходного диола(I) и реакционной массы.

Возможно кратное увеличение производительности за счёт последовательного добавления ячеек в реакционную зону реактора, с последующим увеличением скорости потока реакционной массы. Данное решение, однако, может приводить к закипанию реакционной массы, вследствие повышения давления в первых ячейках установки до критических значений и снижения давления в ячейке перед зоной термостатирования.

Наиболее оптимальным решением для кратного повышения производительности установки является схема с параллельно работающими ячейками. Данный подход, в отличие от первых двух, не будет иметь конструктивных ограничений.

Реакционную смесь после проточного реактора, также возможно передавать в роторный испаритель непосредственно после экспозиции в ячейке, что позволит сократить общее время синтеза еще на ~40 мин. Разработанная технология позволяет получать эфир(II), подходящий для получения готовой АФС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены оптимальные концентрации реагентов в исходных растворах, позволяющие достичь производительности проточного микрореактора объемом 137 мл, которая эквивалентна производительности емкостного реактора объемом 100 л.

Повышение концентрации реагентов в реакционной массе от 50 до 110 г/л не приводит к изменению качества продукта реакции.

Оптимальными условиями процесса являются: скорость потока реакционной массы 40 мл/мин, температура 100 °С, 5-процентный молярный избыток тионилхлорида, давление 7,0–8,0 бар и концентрация исходного диола(I) в реакционной массе 110 г/л.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Krebs Dietrich, Ozegowski Werner, Gutsche Walter, Heinecke Horst, Jungstand Walter, Knoell Hans, Wianke Heinrich. Verfahren Zur Herstellung Von 1-stellung Substituierten [5-bis-(chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-alkancarbonsäuren. Patent DD34727 A1, DD 10209163 A; 28.12.1964.

2. Bhuwan Bhaskar Mishra, Nikunj Shambhubhai Kachhadia, Vinod Singh Tomar, Saswata Lahiri. An improved process for the preparation of bendamustine hydrochloride. Patent WO 2013/046223 A1, PCT/IN2012/000534; 04.04.2013.
3. Kai Groh, Holder Rauter, Dirk Born. Process for the production of bendamustine alkyl ester, bendamustine, and derivatives thereof. Patent US 8481751 B2, US 13/334,402 ; 09.07.2013.
4. Bandi Parthasaradhi Reddy, Kura Rathnakar Reddy, Dasari Muralidhara Reddy, Bandi Vamsi Krishna. Process for bendamustine hydrochloride. Patent US20140121384 A1, US 14/IN2012/000367. 01.05.2014.
5. Moldavsky A. L., Yurakov A. M., Supurgibekov M. B., Elagin P. I., Lalaev B Yu., Fridman I. A. Synthesis of bendamustine hydrochloride in flow microreactor. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 134–138 (in Russ.).
6. B.B. Mishra, N.S. Kachhadia, V.S. Tomar, S. Lahiri. Process for the preparation of bendamustine hydrochloride. Patent US 2015105561A1. 26.09.2011.

Оригинальная статья/Research article

Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента

О. А. Терентьева^{1*}, Е. В. Флисюк¹, Д. Ю. Ивкин^{1**}, И. А. Наркевич¹

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

*Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

**Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Статья получена: 05.11.2019. Статья принята к печати: 10.12.2019

Резюме

Введение. Создание эффективного и безопасного отечественного нейропротектора, обладающего комплексом плейотропных эффектов, реализуемых, в том числе через специфические орфанные рецепторы (SUCNR1, HCA2) на глиальных клетках, является актуальной задачей современной фармакологии и перспективной возможностью фармакотерапии черепно-мозговой травмы и cerebrovasculary заболеваний. В идеале такой препарат должен способствовать восстановлению когнитивных функций и физической работоспособности после повреждений ЦНС, а его применение – повысить качество жизни пациентов и снизить риски развития осложнений.

Цель. Разработка научно обоснованного состава и технологии таблеток нового лекарственного препарата, обладающего нейропротекторным действием, с использованием дробного факторного эксперимента и функции желательности.

Материалы и методы. Были изучены форма и размер частиц, физико-химические (растворимость, температура плавления) и технологические свойства (насыпная плотность, коэффициент прессуемости, фракционный состав, гигроскопичность) фармацевтической субстанции производного ДЭАЭ согласно методикам, описанным в Государственной Фармакопее XIV издания. С целью выбора научно обоснованного состава готовой лекарственной формы был выбран трехфакторный дробный план на основе латинского квадрата 4×4 . Для проверки значимости факторов было проведено 16 опытов. Полученные в соответствии с матрицей планирования таблетки исследовали на распадаемость, прочность на раздавливание, истираемость, гигроскопичность. Для оптимизации показателей качества таблеток использовали обобщенную функцию желательности Харрингтона.

Результаты и обсуждение. Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции пДЭАЭ показало, что она представляет собой высоко гигроскопичный аморфный порошок белого или светло-желтого цвета без запаха, склонный к образованию агломератов с последующим растеканием, обладающий неудовлетворительными технологическими свойствами. Порошок очень легко растворим в воде. С учетом значений общей функции желательности лучший результат показал образец № 4, в состав которого входят маннитол (разбавитель A_4), кальция стеарат (скользящее вещество B_1), частично прежелатинизированный кукурузный крахмал (связующее вещество C_4).

Заключение. Были изучены физико-химические и технологические свойства субстанции производного ДЭАЭ. Производное ДЭАЭ представляет собой высоко гигроскопичное вещество. На основании метода математического планирования эксперимента и проведенных исследований был подобран и научно обоснован состав таблеток пДЭАЭ: субстанция пДЭАЭ 60 мг, маннитол, частично прежелатинизированный кукурузный крахмал, кальция стеарат. Средняя масса таблетки 300 мг. Подобраны параметры прессования таблеток. Полученные таблетки по качественным показателям отвечают требованиям ГФ XIV издания.

Ключевые слова: астения, нейропротекторное средство, таблетки, оптимизация состава, метод Харрингтона.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Д. Ю. Ивкин обосновал актуальность исследования. О. А. Терентьева разработала и выполнила эксперимент. О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк участвовали в обработке полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Авторы благодарят компанию «ФармВилар» за предоставление образцов марок SuperTab® 24 AN и SuperStarch® 200. Авторы благодарят компанию «BASF» за предоставление образцов марок Kollidon® 90 F, Kollidon® VA 64.

Для цитирования: Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А. Разработка состава и технологии таблеток нового нейропротекторного средства с использованием дробного факторного эксперимента. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 18–22.

Development of the Composition and Technology of New Neuroprotective Drug Tablets Using Fractional Factorial Design

Oksana A. Terenteva^{1*}, Elena V. Flisyuk¹, Dmitry Yu. Ivkin^{1**}, Igor A. Narkevich¹

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

*Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

**Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received: 05.11.2019. Accepted: 10.12.2019

Abstract

Introduction. The creating an effective and safe domestic neuroprotective medicines with a complex of pleiotropic effects realized through specific orphan receptors (SUCNR1, HCA2) of glial cells, is a pressing problem of modern pharmacology and a promising possibility of pharmacotherapy of brain injury and cerebrovascular diseases. Ideally, the medicine should helps restore lost cognitive functions and physical performance after damage to the central nervous system, and its use should improve the quality of life of patients and reduce the risk of complications.

© Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Наркевич И. А., 2020

© Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A., 2020

Aim. To develop composition and technology of a new medicine tablets with neuroprotective effect, using fractional factorial design of experiment and the Harrington desirability function.

Materials and methods. The shape and size of particles, physicochemical (solubility, melting point) and technological properties (bulk density, compressibility factor, fractional composition, hygroscopicity) of the pharmaceutical substance of DEAE derivative were studied according to the methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th edition). A three-factor fractional plan based on the 4 × 4 Latin square design for selection a scientifically based composition of solid dosage form was chosen. 16 experiments to test the significance of the factors were carried out. The tablets obtained according to the planning matrix were investigated for disintegration; tablet crush resistance, friability, and hygroscopicity. To optimize the quality of the tablets, the generalized Harrington desirability function was used.

Results and discussion. The study of the physicochemical and technological properties of the DEAE derivative substance showed that it is a highly hygroscopic, amorphous, white or pale yellow, odourless powder, prone to the formation of agglomerates. The powder is very easily soluble in water. Taking into account the values of the general desirability function, the best result was shown by sample № 4 consisting of mannitol, calcium stearate, and partially pregelatinized maize starch.

Conclusion. The physicochemical and technological properties of the DEAE derivative were studied. The DEAE derivative is a highly hygroscopic substance. Via the method of mathematical planning of the experiment the composition of DEAE derivative tablets was selected and scientifically grounded: DEAE derivative 60 mg, mannitol, partially pregelatinized maize starch, calcium stearate. The average tablet weight is 300 mg. The parameters of pressing tablets were selected.

Keywords: asthenia, neuroprotective agent, tablets, formulation optimization, Harrington desirability function.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Dmitry I. Ivkin justified the relevance of the study. Oksana A. Terenteva developed and carried out the experiment. Oksana A. Terenteva, Elena V. Flisyuk participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. The authors thank PharmVilar for providing samples of SuperTab® 24 AN and SuperStarch® 200 brands. Also the authors thank the company «BASF» for providing samples of the Kollidon® 90 F, Kollidon® VA 64 grades.

For citation: Terenteva O. A., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Narkevich I. A. Development of the composition and technology of new neuroprotective drug tablets using fractional factorial design. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 18–22.

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания (ЦВЗ) являются важнейшей медико-социальной проблемой современной неврологии, поскольку демонстрируют самые высокие показатели по заболеваемости, смертности и инвалидизации населения практически во всех странах мира. Ежегодно в России регистрируют в среднем около 400–450 тыс. инсультов (80–85 % ишемических), из которых до 200 тыс. заканчиваются смертью пациента, а из выживших не менее 80 % остаются инвалидами, несмотря на стремительное развитие медицинских технологий, сотни публикаций и диссертаций об эффективном лечении данной патологии [1]. За последние годы во всем мире отмечается стойкая тенденция к «омоложению» контингента больных с цереброваскулярной патологией [2], прежде всего с острым инсультом, что связано с прогрессирующим ростом в обществе экстремальных воздействий и недостаточной реализацией программ профилактики социально значимых заболеваний, каковыми являются артериальная гипертензия и атеросклероз.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – одна из ведущих причин смертности и инвалидизации у молодых людей. Выжившие после ЧМТ часто страдают от долгосрочных изменений личности, а также от когнитивных и двигательных нарушений, срочно требуя новых фармакотерапевтических мероприятий. Частыми последствиями ЧМТ являются: личностные изменения, судорожные припадки, когнитивные расстройства, нарушения двигательных функций и сниженное качество

жизни, требующей долгосрочной реабилитации и лечения [3, 4]. На сегодняшний день все клинические испытания нейропротекторных средств, проводимые на пациентах с тяжелой черепно-мозговой травмой закончились неудачей. И хотя, поиски средства, которое в одиночку могло бы нейтрализовать последствия черепно-мозговой травмы все еще продолжаются, комбинации различных соединений, имеющих нейропротективные, противовоспалительные и регенерацио-стимулирующие свойства являются также перспективными.

Обобщая, можно сказать, что поиск клинически эффективных при ЦВЗ и ЧМТ лекарственных средств – одна из главных задач исследовательского общества и фарминдустрии.

В Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете в 2015 году было синтезировано и запатентовано производное диэтиламиноэтанола (пДЭАЭ) – бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (2:1) (рисунок 1) [5].

В ходе фармакологических исследований у данного вещества был выявлен комплекс плеiotропных эффектов: антигипоксический, нейропротекторный, адаптогенный и антиоксидантный [6, 7]. Соединение является малотоксичным, а по эффективности сопоставимо с используемыми на практике отдельно взятыми ноотропами, противогипоксическими и актопротекторными препаратами [7]. Целью данного исследования было изучение физико-химических и

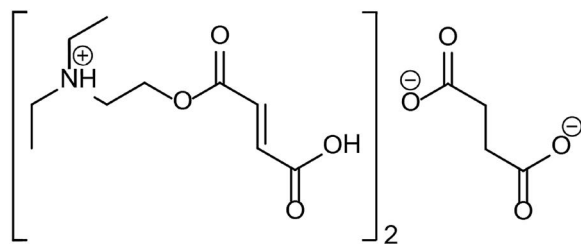


Рисунок 1. Структурная формула бис[2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата (2:1)

Figure 1. The structural formula of bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanaminium] butanedioate (2:1)

технологических свойств фармацевтической субстанции, выбор научно обоснованного состава и режима таблетирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки состава и технологии таблеток пДЭАЭ были изучены растворимость, физико-химические и технологические свойства фармацевтической субстанции согласно методикам, описанным в Государственной Фармакопее XIV издания [8].

Форму и размер частиц субстанции пДЭАЭ определяли методом электронной микроскопии электронным микроскопом JEOL JSM-64902V при 15 кВ с детектором SEI в высоком вакууме.

Были изучены гигроскопичность субстанции пДЭАЭ и напрессованных таблеток различного состава. Таблетку или образец субстанции точной навески 0,5 г в бюксе без крышки помещали в климатическую камеру постоянных условий с температурой 25 °С и относительной влажностью 80 % на 24 ч. Влагопоглощающую способность субстанции определяли по увеличению массы во времени.

Высокая гигроскопичность субстанции является критическим параметром, который следует принимать во внимание при разработке лекарственного препарата, и влечет за собой необходимость специальных условий хранения, расфасовки и специальной упаковки готового лекарственной формы.

При выборе технологии и состава таблеток, содержащих гигроскопичные вещества, существенная роль принадлежит правильному подбору вспомогательных веществ, снижающих гигроскопичность действующего вещества, а также проведению технологических операций, направленных на снижение влагосорбционных свойств таблеток.

С целью уменьшения ошибки эксперимента, сокращения опытов и выбора научно обоснованного состава готовой лекарственной формы был выбран трехфакторный дробный план на основе латинского квадрата 4 × 4. В соответствии с аналогичной разработкой [9] в качестве факторов, влияющих на качество

таблеток, были выбраны: А – вид наполнителя, который определяет массу и внешний вид таблеток; В – вид скользящего вещества, улучшающего сыпучесть прессуемой массы; С – вид связующего вещества, улучшающего прессуемость таблетлируемой массы, прочность таблеток (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика переменных факторов, влияющих на показатели качества таблеток производного ДЭАЭ

Table 1. Characteristics of the variable factors affecting the quality indicators of DEAE derivative tablets

Уровни	Факторы		
	А	В	С
1	Лактоза (SuperTab® 24 AN)	Кальция стеарат	Kollidon® 90 F
2	МКЦ (VIVAPUR® 112)	Магния стеарат	Kollidon® 25
3	Кальция гидрофосфат (DI-CAFOS® A150)	Аэросил	Kollidon® VA 64
4	Маннитол (Pearlitol® 100 SD)	Тальк	SuperStarch® 200

В качестве критериев оптимизации были выбраны параметры, характеризующие качество таблеток: Y_1 – прочность на раздавливание, Н; Y_2 – время распадаемости таблеток, с; Y_3 – истираемость таблеток, %; Y_4 – количество поглощенной влаги таблетками, %.

Прочность таблеток на раздавливание определяли на тестере Erweka TBH 125 TDP, Германия; распадаемость таблеток определяли на тестере распадаемости таблеток Erweka ZT 221, Германия; истираемость таблеток определяли на тестере истираемости таблеток Erweka TAB 220, Германия; влагопоглощение измеряли по приросту массы таблеток в климатической камере Memmert.

Для проверки значимости факторов, влияющих на показатели качества таблеток, было проведено 16 опытов, предусмотренных матрицей планирования.

Для оптимизации показателей качества таблеток использовали обобщенную функцию желательности Харрингтона [10], выраженную уравнением (1):

$$D = \sqrt[4]{d_1 d_2 d_3 d_4}, \quad (1)$$

где d_i – желательности показателей качества таблеток.

Для построения графика зависимости желательности от значений критериев оптимизации использовали метод количественных оценок с интервалом значений желательностей от 0 до 1. Где значению $d_i = 0$ соответствует наилучшее значение соответствующего оцениваемого показателя качества таблеток, $d_i = 1$ – наихудшему. Промежуточные значения желательностей имеют следующие числовые выражения: (1,00–0,80) – очень хорошо, (0,80–0,63) – хорошо, [0,63–0,37] – удовлетворительно, (0,37–0,20) – плохо, [0,20–0,00] – очень плохо.

Использование данного метода с целью получения интегрального критерия требует первоначального задания границ допустимых значений для всех критериев оптимизации. Ограничения могут быть односторонними ($y_{\min}$ или $y_{\max}$) или двусторонними ($y_{\min}$ и $y_{\max}$). При одностороннем ограничении отметке d_i равное 0,37 на шкале желательности соответствует $y_{\min}$ или $y_{\max}$ (задан нижний или верхний предел соответственно), при двустороннем ограничении – и $y_{\min}$, и $y_{\max}$ [10].

Если ограничение одностороннее ($y < y_{\max}$ или $y < y_{\min}$), то функция желательности выражается уравнением (2):

$$d = e^{-e^{-y}}. \quad (2)$$

Если ограничения двусторонние ($y < y_{\min}$ и $y < y_{\max}$), то функция желательности задается уравнением (3):

$$d' = e^{e^{-|y'|^n}}, \quad (3)$$

где y' – промежуточное значение параметра y при переводе в желательность, определяемое по формуле (4):

$$y' = \frac{2y - (y_{\max} + y_{\min})}{y_{\max} - y_{\min}}, \quad (4)$$

где y – числовое значение оцениваемого фактора; $y_{\max}$ – верхняя граница допустимых значений оцениваемого фактора; $y_{\min}$ – нижняя граница допустимых значений оцениваемого фактора.

Перевод качественных параметров в соответствующие желательности производился для каждого параметра отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции пДЭАЭ показало, что она представляет собой высоко гигроскопичный аморфный порошок белого или светло-желтого цвета без запаха, склонный к образованию агломератов с последующим растеканием, обладающий неудовлетворительными технологическими свойствами. Порошок очень легко растворим в воде; легко растворим в этиловом спирте, диметилформамиде, диметилсульфоксиде; растворим в ацетоне; практически не растворим в эфире петролейном, нормальном гексане, бутилацетате. Фракционный состав субстанции в основном представлен частицами 0,5–1 мм (66,67 %). Насыпная плотность субстанции до уплотнения составляет 0,492 г/мл, после уплотнения – 0,632 г/мл. Коэффициент прессуемости субстанции 0,22. Прессуемость модельных таблеток – 75 Н. Угол естественного откоса (42 ± 2)°. Температура плавления 97–98 °С. Содержание воды не более 0,5 % [11].

При изучении гигроскопичности субстанция пДЭАЭ показала увеличение массы на ($52,570 \pm 0,996$) % за 24 ч и характеризуется как расплывающаяся.

Субстанция пДЭАЭ обладает высокой способностью сорбировать влагу из окружающей среды при том, связываясь с ней, растворяться и переходить в жидкое агрегатное состояние. Данная особенность является критичной при отработке технологии таблетирования и подборе вспомогательных веществ, поэтому нуждается в изучении.

Матрица планирования эксперимента и полученные результаты исследований по оптимизации состава таблеток пДЭАЭ представлены в таблице 2.

С учетом значений общей функции желательности лучший результат показал образец № 4, в состав которого входят маннитол (разбавитель A_4), кальция стеарат (скользящее вещество B_1), частично прежелатинизированный кукурузный крахмал (связующее вещество C_4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были изучены физико-химические и технологические свойства субстанции пДЭАЭ. Субстанция пДЭАЭ является гигроскопичной, что влияет на разработку технологии таблетирования.

На основании метода математического планирования эксперимента и проведенных исследований был подобран и научно обоснован состав таблеток пДЭАЭ: субстанция пДЭАЭ 60 мг, маннитол, частично прежелатинизированный кукурузный крахмал, кальция стеарат. Средняя масса таблетки 300 мг. Таблеткирующую массу прессовали на лабораторном автоматическом однопуансонном таблеточном прессе C&C 600 Series методом прямого прессования с диаметром матрицы 9 мм. Среднее усилие прессования – 4,5–5,0 кН, скорость прессования – 20–25 таблеток/мин. Полученные таблетки по показателям качества отвечали требованиям ГФ XIV издания.

ЛИТЕРАТУРА

- Парфенов В. А., Хасанова Д. Р. Ишемический инсульт. М.: МИА. 2012: 288.
- Стаховская Л. В., Котова С. В. Инсульт. Руководство для врачей. М.: МИА. 2014: 400.
- Потапов А. А., Крылов В. В., Лихтерман Л. Б., Талыпов А. Э., Гаврилов А. Г., Петриков С. С. Лечение пострадавших с тяжелой черепно-мозговой травмой. Клинические рекомендации. М., 2014: 22.
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement.* 2013; 9(1): 63–75. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Оковитый С. В., Шустов Е. Б., Болотова В. Ц., Титович И. А. Нейропротекторное средство на основе бис[2-[(2Е)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. Рос. Федерация: патент № 2015118789/152588365. 27.06.2016.
- Шустов Е. Б., Каркищенко В. Н., Семёнов Х. Х., Оковитый С. В., Болотова В. Ц., Юсковец В. Н. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием. *Биомедицина.* 2015; 1: 18–23.
- Оковитый С. В., Радько С. В. Применение сукцинатов в спорте. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* 2015; 6(92): 59–65.
- Государственная фармакопея XIV издания.

Таблица 2. Матрица планирования и результаты эксперимента оптимизации показателей качества таблеток пДЭАЭ

Table 2. Planning matrix and results of the optimization experiment of the quality indicators of DEAE derivative tablets

№ состава	Факторы			Y_1, H	d_1	Y_2, c	d_2	$Y_3, \%$	d_3	$Y_4, \%$	d_4	D
	A	B	C									
1	A ₁	B ₁	C ₁	175,7 ± 17,6	0,538	479 ± 9	0,406	0,03	0,994	16,56 ± 0,23	0,006	0,188
2	A ₂	B ₁	C ₂	>300	0,110	>15	0,000	0,06	0,994	14,86 ± 0,50	0,034	0
3	A ₃	B ₁	C ₃	177,6 ± 15,3	0,521	>15	0,000	0,04	0,994	11,74 ± 0,29	0,213	0
4	A ₄	B ₁	C ₄	108,7 ± 14,3	0,418	414 ± 11	0,522	0,01	0,995	13,08 ± 0,41	0,115	0,398
5	A ₁	B ₂	C ₄	76,3 ± 9,6	0,267	559 ± 5	0,261	0,05	0,994	12,98 ± 0,23	0,122	0,303
6	A ₂	B ₂	C ₃	237,4 ± 11,8	0,224	>15	0,000	0,02	0,995	14,14 ± 0,11	0,060	0
7	A ₃	B ₂	C ₁	122,4 ± 13,4	0,521	>15	0,000	0,06	0,994	11,52 ± 0,18	0,232	0
8	A ₄	B ₂	C ₂	187,4 ± 24,7	0,444	546 ± 4	0,284	0,04	0,994	12,40 ± 0,08	0,162	0,377
9	A ₁	B ₃	C ₂	139,6 ± 21,9	0,724	687 ± 12	0,078	0,05	0,994	14,92 ± 0,26	0,033	0,207
10	A ₂	B ₃	C ₁	227,4 ± 23,1	0,254	>15	0,000	0,06	0,994	14,98 ± 0,22	0,031	0
11	A ₃	B ₃	C ₄	38,5 ± 4,6	0,168	354 ± 3	0,618	0,17	0,992	12,34 ± 0,09	0,166	0,362
12	A ₄	B ₃	C ₃	144,9 ± 34,9	0,824	742 ± 16	0,035	0,02	0,995	13,08 ± 0,34	0,115	0,240
13	A ₁	B ₄	C ₃	170,1 ± 10,7	0,595	818 ± 23	0,007	0,02	0,995	13,68 ± 0,22	0,081	0,137
14	A ₂	B ₄	C ₄	84,7 ± 4,3	0,298	>15	0,000	0,19	0,991	12,54 ± 0,09	0,152	0
15	A ₃	B ₄	C ₂	106,6 ± 18,4	0,405	>15	0,000	0,09	0,993	12,12 ± 0,22	0,183	0
16	A ₄	B ₄	C ₁	185,0 ± 10,1	0,461	695 ± 12	0,071	0,01	0,995	12,68 ± 0,26	0,142	0,309

- Холтоев Ф. Т., Файзуллаева Н. С., Усуббаев М. У., Хакимов Х. М. Выбор состава и разработка технологии таблеток сухого экстракта стевии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37(6): 42–45.
- Сосюкин А. Е., Верведа А. Б. Практические аспекты использования функции желательности при проведении психофизиологического обследования персонала аварийно-спасательных формирований. *Профилактическая медицина*. 2015; 16: 872–884.
- Терентьева О. А., Белоусова И. С., Ефремов И. В., Флисюк Е. В. Изучение физико-химических и технологических свойств фармацевтической субстанции на основе бис[2-[(2E)-4-гидроксипропан-2-илокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 14–15 ноября. СПб.: Изд-во СПбФУ. 2018: 369–372.
- The State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th) (in Russ.).
- Holtov F. T., Faizullaeva N. S., Usupbaev M. U., Hakimov H. M. The choice of composition and technology development tablets of dry extract of stevia. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2003; 37(6): 42–45 (in Russ.).
- Sosukin A. E., Verveda A. B. Practical aspects of using the desirability function for a psychophysiological examination of the personnel of search-and-rescue detachments. *Preventive medicine*. 2015; 16: 872–884 (in Russ.).
- Terenteva O. A., Belousova I. S., Efremov I. V., Flisyuk E. V. Study of the physicochemical and technological properties of a pharmaceutical substance based on bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanaminium] butanedioate. The materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Innovations in the health of the nation», St. Petersburg, November 14–15. SPb.: Publishing house SPHFU. 2018: 369–372. (in Russ.)

REFERENCES

- Parfenov V. A., Hasanov D. R. Ischemic stroke. M.: MIA. 2012: 288 (in Russ.).
- Stahovskaya L. V., Kotova S. V. Stroke. A guideline for doctors. M.: MIA. 2014: 400 (in Russ.).
- Potapov A. A., Krylov V. V., Lihterman L. B., Talipov A. E., Gavrilov A. G., Petrikov S. S. Treatment of victims with severe traumatic brain injury. Clinical guidelines. M.: 2014; 22 (in Russ.).
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's Dement*. 2013; 9(1): 63–75. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Okovity S. V., Shustov E. B., Bolotova V. Ts., Titovich I. A. Neuroprotective agent based bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamine] butanedioate. Grew up. Federation: Patent No. 2015118789/152588365. 06/27/2016 (in Russ.).
- Shustov E. B., Karkischenko V. N., Semenov H. H., Okovity S. V., Bolotova V. C., Yuskovec V. N. Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action. *Biomedicine*. 2015; 1: 18–23 (in Russ.).
- Okovity S. V., Radko S. V. The application of succine in sports. Problems of balneology, physiotherapy, and exercise therapy. 2015; 6(92): 59–65 (in Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-23-28>
УДК 615.014.21



Оригинальная статья/Research article

Разработка таблеток, содержащих гигроскопичное активное вещество, с применением твердых дисперсий

О. А. Терентьева^{1,2*}, В. А. Вайнштейн¹, Е. В. Флисюк¹, Ю. Э. Генералова¹

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

2 – ФГБУН «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева» Российской академии наук (ИМЧ РАН), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 9

*Контактное лицо: Терентьева Оксана Андреевна. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

Статья получена: 13.01.2020. Статья принята к печати: 17.02.2020

Резюме

Введение. Черепно-мозговая травма представляет собой повреждение черепа и внутримозгового содержимого под влиянием механического воздействия. ЧМТ является одной из основных причин смерти и инвалидизации среди молодежи и представляет собой важную медико-социальную проблему. Поэтому задача разработки новых более эффективных ноотропных и антиастенических препаратов в рамках восстановительной неврологии рассматривается как одна из приоритетных задач медицинской науки в России.

Цель. Разработать состав и технологию таблеток, содержащих гигроскопичное вещество, используя твердые дисперсии.

Материалы и методы. Фармацевтическая субстанция производного диэтиламиноэтанола, обладающая антигипоксическим, нейропротекторным, адаптогенным и антиоксидантным действиями, представляет собой гигроскопичный порошок. В качестве матрицы для создания твердой дисперсии был выбран ПЭГ 6000. Твердую дисперсию получали двумя способами – сплавлением и экструзией горячего расплава. Технологические свойства гранулята и показатели качества таблеток определяли по методикам, описанным в ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. Лактоза, введенная в сплав пДЭАЭ-ПЭГ, позволяет улучшить технологические свойства гранулята, что облегчает процесс таблетирования и обеспечивает хорошие показатели качества таблеток.

Заключение. Использование ПЭГ 6000 в качестве матрицы для гигроскопичной субстанции пДЭАЭ позволило снизить его влагопоглощающую способность. Увеличение содержания ПЭГ не приводило к значительному изменению кинетики высвобождения пДЭАЭ из таблеток.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, нейропротекторное средство, таблетки, твердые дисперсии, гигроскопичность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. А. Вайнштейн разработал модель эксперимента. О. А. Терентьева выполнила эксперимент. Ю. Э. Генералова определяла количественное содержание действующего вещества методом ВЭЖХ. О. А. Терентьева, Е. В. Флисюк участвовали в обработке полученных данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Авторы благодарят компанию «ФармВилар» за предоставление образцов марок SuperTab® 24 AN и SuperStarch® 200.

Для цитирования: Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Флисюк Е. В., Генералова Ю. Э. Разработка таблеток, содержащих гигроскопичное активное вещество, с применением твердых дисперсий. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 23–28.

Tablet Development for a Hygroscopic Drug Using Solid Dispersion

Oksana A. Terenteva^{1,2*}, Viktor A. Vainshtein¹, Elena V. Flisyuk¹, Yuliya E. Generalova¹

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

2 – N. P. Bekhtereva Institute of the Human Brain, Russian Academy of Sciences, 9 Akad. Pavlova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Oksana A. Terenteva. E-mail: oksana.terentyeva@pharminnotech.com

Received: 13.01.2020. Accepted: 17.02.2020

Abstract

Introduction. Traumatic brain injury is a damage to the brain from an external mechanical force, possibly leading to permanent or temporary impairment of cognitive, physical, and psychosocial functions. It is a leading cause of death and disability among children and young adults. In connection with the above, the objective of developing new, more effective nootropic and antiasthenic drugs in the framework of restorative neurology is considered as one of the priority tasks of medical science in Russia.

Aim. Development the composition and technology of tablets containing a hygroscopic substance using solid dispersions.

Materials and methods. The pharmaceutical substance of a diethylaminoethanol derivative having antihypoxic, neuroprotective, adaptogenic and antioxidant effects is a hygroscopic powder. PEG 6000 was chosen as a matrix for solid dispersion production. Solid dispersions were obtained by high shear mixing and hot-melt extrusion. The technological properties of granulate and the quality indicators of the tablets were determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th edition).

Results and discussion. The lactose mixed with the DEAE-PEG composition alloy improve the technological properties of granulate.

Conclusion. A decrease water-absorbing ability of DEAE was achieved using PEG 6000 as a matrix carrier. The increase PEG content did not lead to a significant change in the kinetics of the release of DEAE from tablets.

Keywords: traumatic brain injury, neuroprotective agent, tablets, solid dispersion, hygroscopicity.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Терентьева О. А., Вайнштейн В. А., Флисюк Е. В., Генералова Ю. Э., 2020

© Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Flisyuk E. V., Generalova Yu. E., 2020

Contribution of the authors. Victor A. Vainshtein developed the experiment. Oksana A. Terenteva carried out the experiment. Yuliya E. Generalova determined the concentration of the DEAE by HPLC. Oksana A. Terenteva, Elena V. Flisyuk participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Acknowledgment. The authors thank PharmVilar for providing samples of SuperTab® 24 AN and SuperStarch® 200 brands.

For citation: Terenteva O. A., Vainshtein V. A., Flisyuk E. V., Generalova Yu. E. Tablet development for a hydroscopic drug using solid dispersion. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 23–28.

ВВЕДЕНИЕ

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) представляет собой повреждение черепа и внутричерепного содержимого под влиянием механического воздействия. ЧМТ является одной из основных причин смерти и инвалидности среди молодежи [1] и представляет собой важную медико-социальную проблему. Эффективная нейропротекторная терапия для пациентов с ЧМТ вышла на первый план среди факторов, которые могут привести к положительным результатам у пациентов с тяжелыми травмами. Поэтому задача разработки новых более эффективных ноотропных и антиастенических препаратов в рамках восстановительной неврологии рассматривается как одна из приоритетных задач медицинской науки в России.

Новое производное диэтиламиноэтанола (пДЭАЭ) (бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоат) [2] (рисунок 1) обладает антигипоксическим, нейропротекторным, адаптогенным и антиоксидантным действиями, которые были подтверждены *in vivo* [3–5]. Соединение обладает низкой токсичностью и высокой эффективностью. Производное ДЭАЭ представляет собой белый или светло-желтый аморфный порошок без запаха. Обладает высокой способностью поглощать влагу из окружающей среды, переходя в жидкое агрегатное состояние. При изучении гигроскопичности пДЭАЭ показало прирост массы на $(52,570 \pm 0,996) \%$ через 24 часа при 25°C и относительной влажности 80% [6]. Согласно Европейской фармакопеи субстанция характеризуется как расплывающаяся.

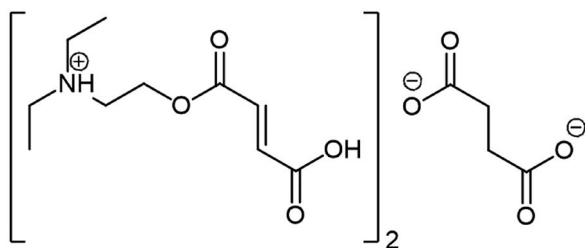


Рисунок 1. Структурная формула бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата

Figure 1. The structural formula of bis{2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanaminium} butandioate

Целью данного исследования была разработка состава и технологии таблеток пДЭАЭ. Субстанция обладает высокой гигроскопичностью, что неблагоприятно сказывается на стабильности готовых лекарственных препаратов, поэтому необходимо было предпринять меры по снижению его неудовлетворительных свойств. Применение твердых дисперсий рассматривалось как способ снижения гигроскопичности пДЭАЭ. Предполагалось, что молекулы пДЭАЭ, заключенные в полимерную матрицу, будут иметь более низкое значение поглощения влаги, что упростит процесс таблетирования и увеличит стабильность и срок годности препарата.

В качестве полимерной матрицы использовали полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ 6000).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата был синтезирован в Санкт-Петербургском химико-фармацевтическом университете на кафедре органической химии (Санкт-Петербург, Россия). Полиэтиленгликоль 6000 фирмы Clariant (Зульцбах, Германия), безводная лактоза (SuperTab® 24AN) и частично прежелатинизированный кукурузный крахмал SuperStarch® 200, DFE Pharma были предоставлены фирмой «ФармВилар».

Методы

1. Приготовление композиции пДЭАЭ-ПЭГ

Для получения расплава в выпарительной чашке на водяной бане расплавляли ПЭГ 6000 и добавляли в него предварительно высушенный в эксикаторе над силикагелем порошок пДЭАЭ, тщательно перемешивая. Полученную однородную массу выливали на металлическую поверхность струей и охлаждали при комнатной температуре до полного затвердевания. Застывшую массу протирали через сито с диаметром отверстий 2,0 мм. Состояние полученного гранулята оценивали визуально. Составы и технологические параметры смесей (№ 1–4) приведены в таблице 1.

Таблица 1. Составы и технологические параметры смесей № 1–11

Table 1. The compositions of the mixtures and technological parameters

Состав №	Соотношение (г/г)			Т, °С	Диаметр сита, мм	Скорость вращения шнеков, об/мин
	пДЭАЭ	Лактоза	ПЭГ			
1	1	–	4	80	2,0	–
2	1	–	3	80	2,0	–
3	1	–	2	80	2,0	–
4	1	–	1	80	2,0	–
5.1	1	2	1	80	1,0	–
6.1	1	3	2	80	1,0	–
7.1	1	4	3	80	1,0	–
8.1	1	5	4	80	2,0	–
9.1	1	5	1	80	1,0	–
10.1	1	5	2	80	1,0	–
11.1	1	5	3	80	1,4	–
8.2	1	5	4	60	2,0	20
9.2	1	5	1	80	2,0	20
10.2	1	5	2	80	2,0	20
11.2	1	5	3	80	2,0	20

2. Приготовление композиции ДЭАЭ-ПЭГ-Лак смешиванием с высоким усилием сдвига

Лактозу, ПЭГ, пДЭАЭ в необходимых количествах в ступке с пестиком помещали в сушильный шкаф (80 °С) до полного расплавления. Полученные смеси (№ 5.1–11.1) тщательно перемешивали и протирали через сито. Полученный гранулят хранили в холодильнике при температуре 4–6 °С. Составы и технологические параметры смесей (№ 5–11) приведены в таблице 1.

3. Приготовление композиции ДЭАЭ-ПЭГ-Лак методом экструзии горячего расплава

Смесь сухих веществ, содержащих субстанцию пДЭАЭ, лактозу и ПЭГ, предварительно смешивали в аппарате типа «пьяная бочка» в течение 15 минут при скорости вращения 30 об/мин для достижения однородного перемешивания. Полученную сухую смесь загружали в питательный бункер лабораторного двухшнекового экструдера (Thermo Fisher Haake MiniCTW, Германия). Экструзию проводили без пластины для крепления матрицы ($d = 2,0$ мм) при одинаковой скорости вращения шнеков и температурах. Экструдат измельчали в шаровой мельнице и просеивали через сито 2,0 мм. Полученный гранулят хранили в холодильнике при температуре 4–6 °С. Состав смесей № 8.2–11.2 и технологические параметры процесса экструзии приведены в таблице 1.

4. Процесс таблетирования

Подходящие для прессования грануляты смешивали с вспомогательными веществами (89 % гранулята, 10 % прежелатинизированного крахмала, 1 % стеарата магния) (таблица 2) и прессовали таблетки массой 300 мг на лабораторном автоматическом однопунсонном таблеточном прессе (C&C 600 Series, Китай) с диаметром матрицы 9 мм.

5. Исследование высвобождения пДЭАЭ

Скорость высвобождения пДЭАЭ из таблеток определяли на приборе для теста «Растворение» DT 626 (ERWEKA GmbH, Германия), аппарат II «Лопастная мешалка». Испытание проводили при (37 ± 1) °С со скоростью вращения мешалки 50 об/мин, среда растворения – вода очищенная объемом 900 мл. Через заданные интервалы времени пробы объемом 10 мл отбирали из среды растворения и заменяли таким же объемом растворителя. Образцы фильтровали через мембранный фильтр (RC) с диаметром пор 0,45 мкм и без разбавления переносили в вialу хроматографа.

Таблица 2. Состав таблетлируемых смесей № 8–11

Table 2. The content of excipients and the DEAE in the compositions № 8–11 for tableting process

Вещества		Состав №			
		8.1/8.2	9.1/9.2	10.1/10.2	11.1/11.2
		Содержание в таблетке, %			
Гранулят	пДЭАЭ	8,9	12,7	11,1	9,9
	ПЭГ 6000	35,6	12,7	22,3	29,7
	Лактоза	44,5	63,6	55,6	49,4
Крахмал		10	10	10	10
Магния стеарат		1	1	1	1
Итого:		100	100	100	100

Для определения количества действующего вещества, перешедшего в среду растворения, использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ проводилась с использованием системы хроматографии на микроколонках «Милихром А-02» (Россия), состоящей из двух насосов и УФ-детектора. Разделение осуществляли с использованием колонки ProntoSIL C18 ($2,0 \times 70$ мм, 5 мкм). Система анализа данных состояла из программного обеспечения «АльфаХром» (Россия). Подвижная фаза для изократического элюирования состояла из системы двух растворителей: растворитель А ($0,2$ М LiClO_4 , $0,005$ М HClO_4 , водный раствор) и растворитель В (ацетонитрил). Изократическое элюирование осуществляли с помощью 10 % (мл/мл) растворителя В. Скорость потока составляла 0,1 мл/мин. Разделение проводили при 40 °С, УФ-детекция при 210 нм. Расчёт количественного содержания основного компонента в анализируемом растворе проводили методом градуировочного графика. Процент высвобождения основного вещества (X , %) рассчитывали по формуле (1):

$$X = \frac{T_{grad} \times V_{cp} \times 100}{L \times 1000 \times \omega} = \frac{T_{grad} \times 900 \times 100}{60 \times 1000 \times \omega} = \frac{T_{grad} \times 1,5}{\omega}, \quad (1)$$

где T_{grad} – концентрация анализируемого раствора, определённая по градуировочной прямой, мкг/мл; V_{cp} – объём среды растворения, мл; L – заявленное содержание пДЭАЭ, мг; ω – массовая доля пДЭАЭ в фармацевтической субстанции.

Типичная хроматограмма представлена на рисунке 2.

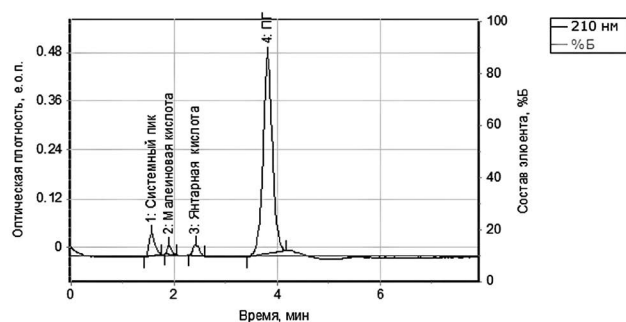


Рисунок 2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора таблеток пДЭАЭ при проведении теста «Растворение»

Figure 2. A typical chromatogram of a test solution of DEAE tablets during the Dissolution test

Высвобождение действующего вещества в среду растворения рассчитывали как процент растворенного вещества по отношению к начальной концентрации в таблетке.

6. Исследование свойств гранулята и качества таблеток

Технологические свойства гранулята: размер частиц [ситовой анализ; электромагнитный ситовой шейкер RP 200N (CISA, Испания)], сыпучесть [тестер сыпучести GT D-63150 (ERWEKA, Германия)], насыпная плотность [тестер насыпной плотности SVM 221 (ERWEKA, Германия)], прессуемость [тестер твердости таблеток ТВН 125 TDP (ERWEKA, Германия)] – определяли по методикам, описанным в ГФ XIV [7].

Изучение гигроскопичности таблеток проводили в климатической камере НРР 110 (Mettmert, Германия) при постоянной температуре 25 °С и относительной влажности 80 % в течение 24 ч. Величину влагопоглощения (W) рассчитывали в % по формуле (2):

$$W = \frac{m_x - m_0}{m_0} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где m_0 – начальная масса образца, г; m_x – масса образца через 24 ч, г.

Прочность на раздавливание [тестер твердости таблеток ТВН 125 TDP (ERWEKA, Германия)], истираемость [тестер истираемости таблеток ТАВ 220 (ERWEKA, Германия)] и распадаемость таблеток [тестер распадаемости таблеток ЗТ 221 (ERWEKA, Германия)] определяли в соответствии с требованиями ГФ XIV [7] к качеству таблеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гранулы № 1–4, полученные сплавлением пДЭАЭ с ПЭГ, были очень пластичными и непригодными для процесса таблетирования. Чтобы увеличить хрупкость

и сыпучесть гранул необходимо было добавить в сплав наполнитель. В качестве наполнителя была выбрана специально разработанная для гигроскопичных фармацевтических веществ безводная лактоза (SuperTab® 24AN, DFE Pharma).

Композиции с добавлением лактозы № 5.1–7.1 прилипали к пуансонам таблеточного пресса, что делало процесс прессования невозможным.

Перспективными для процесса прессования оказались составы № 8–11, полученные в смесителе и экструдере. В связи с этим были изучены их технологические свойства (таблица 3).

Более удовлетворительными технологически свойствами обладали составы, полученные смешением с усилием сдвига. Несмотря на лучшую сыпучесть составов, полученных методом экструзии горячего расплава, они имели более крупные частицы, что приводило к расслоению смеси для таблетирования.

Полученные таблетки имели белый цвет, гладкую поверхность, глянцевый блеск и были исследованы по показателям качества, таким как прочность на сжатие, истираемость, распадаемость, гигроскопичность (таблица 4). Все составы таблеток соответствовали заданным параметрам качества.

Профили высвобождения пДЭАЭ из таблеток приведены на рисунке 3. Анализ профилей высвобождения показал, что концентрация пДЭАЭ более 75 % была достигнута во всех таблетках через 45 минут.

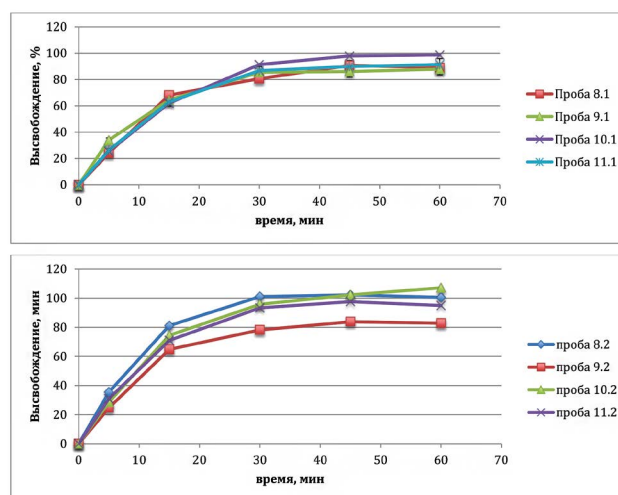


Рисунок 3. Профили высвобождения пДЭАЭ из таблеток составов № 8–11

Figure 3. Comparative dissolution profiles of different formulations of the DEAE in water at 37 °C from tablets № 8–11

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было выбрано два метода получения твердой дисперсии пДЭАЭ с ПЭГ: сплавление ингредиентов и экструзия горячего расплава.

Таблица 3. Технологические свойства гранулятов № 8.1–11.1, 8.2–11.2

Table 3. Technological properties of granulate № 8.1–11.1, 8.2–11.2

Параметр	Состав №			
	8.1	9.1	10.1	11.1
Сыпучесть, г/сек	0,108 ± 0,003	0,104 ± 0,003	0,184 ± 0,007	0,103 ± 0,002
Насыпная плотность до/ после уплотнения, г/мл	0,650 ± 0,019/ 0,766 ± 0,034	0,426 ± 0,017/ 0,571 ± 0,018	0,454 ± 0,022/ 0,609 ± 0,024	0,525 ± 0,016/ 0,661 ± 0,026
Индекс Карр, %	15,14	25,39	25,45	20,57
Пористость	0,23	0,60	0,56	0,39
Коэффициент Хауснера	1,18	1,34	1,34	1,26
Фракционный состав, %				
x > 2,0	2,88	0	0,01	0,07
2,0 > x > 1,0	53,66	0,28	2,10	49,91
1,0 > x > 0,5	20,12	13,0	52,76	31,03
0,5 > x	23,34	86,72	45,13	18,99
Параметр	Состав №			
	8.2	9.2	10.2	11.2
Сыпучесть, г/сек	0,215 ± 0,009	0,238 ± 0,007	0,233 ± 0,007	0,240 ± 0,008
Насыпная плотность до/ после уплотнения, г/мл	0,711 ± 0,021/ 0,797 ± 0,032	0,665 ± 0,020/ 0,786 ± 0,028	0,725 ± 0,026/ 0,790 ± 0,032	0,713 ± 0,026/ 0,795 ± 0,033
Индекс Карр, %	10,79	15,39	8,23	10,31
Пористость	0,15	0,23	0,11	0,14
Коэффициент Хауснера	1,12	1,18	1,09	1,12
Фракционный состав, %				
x > 2,0	4,45	5,43	6,29	3,97
2,0 > x > 1,0	64,91	66,95	58,97	65,49
1,0 > x > 0,5	15,35	10,09	17,60	16,99
0,5 > x	15,29	17,53	17,14	13,55

Таблица 4. Показатели качества таблеток пДЭАЭ

Table 4. Quality parameters of DEAE tablets

Показатель	Состав			
	8.1	9.1	10.1	11.1
Диаметр, мм	9,03 ± 0,03	9,01 ± 0,06	9,04 ± 0,05	9,01 ± 0,06
Толщина, мм	4,40 ± 0,05	4,25 ± 0,18	4,30 ± 0,03	4,34 ± 0,05
Средняя масса, г	0,3035 ± 0,0031	0,3022 ± 0,0034	0,3056 ± 0,0025	0,3026 ± 0,0036
Распадаемость, мин	12,6 ± 0,6	10,3 ± 0,3	12,5 ± 0,4	13,3 ± 1,7
Прочность на сжатие, Н	76,4 ± 8,0	97,6 ± 6,5	104,2 ± 6,6	82,0 ± 15,4
Истираемость, %	0	0,05	0,24	0,44
Влагопоглощение W, %	16,3 ± 0,5	17,3 ± 1,4	16,9 ± 0,2	14,7 ± 0,5
Показатель	Состав			
	8.2	9.2	10.2	11.2
Диаметр, мм	8,90 ± 0,05	8,92 ± 0,01	9,02 ± 0,01	8,93 ± 0,12
Толщина, мм	4,18 ± 0,05	4,14 ± 0,07	4,32 ± 0,07	4,25 ± 0,11
Средняя масса, г	0,2974 ± 0,0042	0,3054 ± 0,0047	0,3029 ± 0,0042	0,3044 ± 0,0055
Распадаемость, мин	14,3 ± 0,8	12,6 ± 1,2	13,0 ± 0,7	14,3 ± 1,4
Прочность на сжатие, Н	57,4 ± 7,9	68,6 ± 10,1	80,7 ± 7,8	61,7 ± 19,5
Истираемость, %	2,26	0,16	0,82	0,51
Влагопоглощение W, %	16,4 ± 0,9	15,8 ± 0,9	15,5 ± 0,1	15,9 ± 0,8

Лактоза, введенная в сплав пДЭАЭ-ПЭГ, позволяет улучшить технологические свойства гранулята, что облегчает процесс таблетирования и обеспечивает хорошие показатели качества таблеток.

Использование ПЭГ 6000 в качестве матрицы для гигроскопичной субстанции пДЭАЭ позволило значительно снизить его влагопоглощающую способность, что положительно сказалось на увеличении стабиль-

ности и срока годности лекарственного препарата (2 года). Увеличение содержания ПЭГ не приводило к значительному изменению кинетики высвобождения пДЭАЭ из таблеток.

Однако, несмотря на то, что лучшими технологическими свойствами обладал гранулят, полученный методом смешения; гранулят, полученный методом экструзии, показал меньший прирост массы при изучении гигроскопичности таблеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смычек В. Б., Пономарева Е. Н. Черепно-мозговая травма: медицинская и социальная проблема. *Медицинские новости*. 2011; 12: 6–8.
2. Оковитый С. В., Шустов Е. Б., Болотова В. Ц., Титович И. А. Нейропротекторное средство на основе бис[2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. *Рос. Федерация: патент* № 2015118789/152588365. 27.06.2016.
3. Шустов Е. Б., Каркищенко В. Н., Семёнов Х. Х., Оковитый С. В., Болотова В. Ц., Юсковец В. Н. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием. *Биомедицина*. 2015; 1: 18–23.
4. Оковитый С. В., Радько С. В. Применение сукцинатов в спорте. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2015; 6(92): 59–65.
5. Титович И. А., Болотова В. Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола. *Биомедицина*. 2016; 2: 77–83.
6. Терентьева О. А., Белоусова И. С., Ефремов И. В., Флисюк Е. В. Изучение физико-химических и технологических свойств фармацевтической субстанции на основе бис[2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксо-

бут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия] бутандиоата. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербург, 14–15 ноября. СПб.: Изд-во СПбХФУ. 2018: 369–372.

7. Государственная фармакопея XIV издания.

REFERENCES

1. Smichek V. B., Ponomareva E. N. Traumatic brain injury: a medical and social problem. *Medical news*. 2011; 12: 6–8 (in Russ.).
2. Okovity S. V., Shustov E. B., Bolotova V. Ts., Titovich I. A. Neuroprotective agent based on bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamino] butanedioate. *Russian Federation: Patent* No. 2015118789/152588365. 06/27/2016 (in Russ.).
3. Shustov E. B., Karkischenko V. N., Semenov H. H., Okovity S. V., Bolotova V. C., Yuskovec V. N. Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action. *Biomedicine*. 2015; 1: 18–23 (in Russ.).
4. Okovity S. V., Radko S. V. The application of succine in sports. *Problems of balneology, physiotherapy, and exercise therapy*. 2015; 6(92): 59–65 (in Russ.).
5. Titovich I. A., Bolotova V. Ts. Experimental study of antihypoxic activity of a new derivative aminoethanol. *Biomedicine*. 2016; 2: 77–83 (in Russ.).
6. Terenteva O. A., Belousova I. S., Efremov I. V., Flisyuk E. V. Study of the physicochemical and technological properties of a pharmaceutical substance based on bis[2-[(2E)-4-hydroxy-4-oxobut-2-enoyloxy]-N,N-diethylethanamium] butanedioate. The materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation «Innovations in the health of the nation». St. Petersburg, November 14–15. SPb.: Publishing house SPHFU. 2018: 369–372. (in Russ.).
7. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th edition) (in Russ.).



49-й межрегиональный специализированный
форум-выставка

ЗДРАВООХРАНЕНИЕ ЧЕРНОЗЕМЬЯ

11-13 марта 2020



E-mail: zdrav@veta.ru
Телефон: +7 (473) 2 100-501



 **ВОРОНЕЖ** <http://veta.ru/zdravoohranenie-49>



Оригинальная статья/Research article

Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3н)-она, методом УФ-спектрофотометрии

Е. С. Мищенко^{1*}, А. Д. Лазарян¹, Т. Т. Лихота¹

¹ – Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России (ПМФИ, филиал ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России), 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

*Контактное лицо: Мищенко Екатерина Сергеевна. E-mail: ekaterina-mishchenko1809@mail.ru

Статья получена: 07.11.2019. Статья принята к печати: 11.12.2019

Резюме

Введение. Исследуемая субстанция является эффективным средством, которое сочетает в себе несколько фармакологических эффектов, а именно: антидепрессивный, анксиолитический и ноотропный. В результате доклинических испытаний, исследуемое соединение показало себя как эффективное средство в борьбе и профилактике острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК). Свои фармакологические эффекты субстанция реализует за счет стимулирования выработки оксида азота эндотелиальными клетками головного мозга, вследствие чего происходит вазодилатация сосудов и улучшение кровотока в ишемизированной части сосудов. Следовательно, для внедрения в медицинскую практику исследуемой биологически активной субстанции, необходимо разработать способы контроля качества как изучаемой субстанции, так и перспективных ее препаратов.

Цель. Целью настоящего исследования явилась разработка методики количественного определения биологически активной субстанции, производной хиназолин-4(3н)-она (лабораторный шифр – VMA-10-18), методом УФ-спектрофотометрии с последующей ее валидацией.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали предварительно очищенную от исходных и промежуточных продуктов синтеза субстанцию VMA-10-18. Данная субстанция представляет собой белый кристаллический порошок, без запаха, гигроскопичный. Предварительные исследования физико-химических свойств, позволили нам использовать в качестве растворителя спирт этиловый 95 %.

Результаты и обсуждение. Определено количественное содержание действующего вещества в субстанции, производной хиназолин-4(3н)-она. Проведен расчет удельного показателя поглощения, с последующей статистической обработкой результатов. Валидационная оценка проведена по показателям «Специфичность», «Линейность», «Правильность», «Повторяемость». Полученные статистические данные свидетельствуют об эффективности разработанной методики и ее экспериментальной воспроизводимости.

Заключение. В результате проведенного исследования, нами разработана методика количественного определения изучаемого соединения, которое может быть предложено для включения в нормативно-техническую документацию на субстанцию VMA-10-18. Установлено количественное содержание действующего вещества в исследуемой субстанции, рассчитан показатель удельного поглощения. Все данные статистически обработаны и соответствуют предъявляемым требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: хиназолин-4(3н)-он, субстанция VMA-10-18, УФ-спектрофотометрия, валидация, острые нарушения мозгового кровообращения.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. С. Мищенко и Т. Т. Лихота проводила количественный анализ исследуемой субстанции. А. Д. Лазарян и Т. Т. Лихота проводили статистическую обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Мищенко Е. С., Лазарян А. Д., Лихота Т. Т. Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3н)-она, методом УФ-спектрофотометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 30–34.

Development of UV-spectrophotometry Method of the Quantitative Determination of a New Substance Quinazoline-4(3h)-on Derivate

Ekaterina S. Mishchenko^{1*}, Anush D. Lazaryan¹, Tat'yana T. Lihota¹

¹ – Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia, 11, Kalinina av., Pyatigorsk, Stavropol region, 357532, Russia

*Corresponding author: Ekaterina S. Mishchenko. E-mail: ekaterina-mishchenko1809@mail.ru

Received: 07.11.2019. Accepted: 11.12.2019

Abstract

Introduction. The aim idea of this research article is a development of the quantitative determination of a biologically active substance quinazolin-4(3H)-on derivate with laboratory cypher «VMA-10-182, by UV-spectrophotometry with followed validation. The substance is an effective remedy that combines several pharmacological effects, like an antidepressant, anxiolytic and nootropic. As a result of preclinical trials, the research compound has proven to be an effective remedy in the fight and prevention of acute cerebrovascular accident (stroke). The substance realized pharmacological effects by stimulating the production of nitric oxide by the endothelial cells of the brain. As a result of stimulating is a vasodilation of the vessels and improvement of blood flow in the ischemic part of the vessels occur. Therefore, for introducing the biologically active substance into medical practice we need to develop ways to control the quality of substance.

Aim. The objective of this research work is to develop a method of the quantitative determination of a biologically active substance, derivative quinazolin-4(3H)-on (laboratory sypher – VMA-10-18), by method of UV spectrophotometry. The results of the research work were validated.

Materials and methods. In this research we used a substance VMA-10-18 which was previously purified from the initial and intermediate products of the synthesis. This substance is a white crystalline powder, odorless, hygroscopic.

© Мищенко Е. С., Лазарян А. Д., Лихота Т. Т., 2020

© Mishchenko E. S., Lazaryan A. D., Lihota T. T., 2020

Results and discussion. The quantitative content of the active substance derived quinazolin-4(3H)-on has been determined. The specific absorption rate was calculated, followed by statistical processing of the results. The validation was carried out according to the «Specificity», «Linearity», «Accuracy», «Repeatability». The results indicate the effectiveness of the developed methodology and experimental reproducibility.

Conclusion. Researches of physicochemical properties show al us use 95 % ethanol as a solvent. As a result we developed a method for the quantitative determination of the substance which can be proposed for inclusion in the normative documents. The quantitative determination of the active substance in the test substance was established, and the specific absorption index was calculated. All information are statistically processed and meet the requirements of regulatory documentation.

Keywords: quinazolin-4(3H)-on, substance VMA-10-18, UV-spectrophotometry, validation, acute cerebrovascular accident.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Ekaterina S. Mishchenko and Tat'yana T. Lihota conducted a quantitative analysis of the investigated substance. Anush D. Lazaryan and Tat'yana T. Lihota conducted statistical processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Mishchenko E. S., Lazaryan A. D., Lihota T. T. Development of UV-spectrophotometry method of the quantitative determination of a new substance quinazoline-4(3h)-on derivate. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 30–34.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ от сосудистых заболеваний сердца и головного мозга в мире ежегодно умирают около 17,5 млн человек (что составляет 30 % смертности от всех заболеваний) [1–3].

Новая субстанция, синтезированная на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского Государственного Медицинского университета, проявляет целый комплекс свойств, способных бороться с ОНМК. Исследуемое соединение является производным хиназолин-4(3H)-она. Лабораторным шифр «VMA-10-18». Химическая формула: 3-[2-(4-метоксифениламино)-2оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она [4–6].

В результате доклинических испытаний у субстанции выявлены свойства, позволяющие рекомендовать её как эффективное антидепрессивное, антигипоксическое и улучшающее мозговое кровообращение средство. Данные виды фармакологической активности объясняются стимулирующим действием субстанции на высвобождение оксида азота эндотелиальными клетками, что влечет за собой улучшение коллатерального кровотока в ишемизированной части сосуда [7].

По своим фармакологическим эффектам, исследуемую субстанцию можно приблизить к таким сосудистым препаратам, как пикамилон и кавинтон.

Пикамилон представляет собой производное гамма-аминомасляной кислоты, оказывающий прямое миорелаксирующее действие на стенку сосудов и улучшающей фармакокинетические свойства ГАМК [8–9].

Кавинтон является препаратом алкалоида винкамина. Данный препарат избирательно улучшает кровоснабжение спазмированных сосудов головного мозга, предотвращает феномен «обкрадывания» [9–10].

Помимо вышеуказанных фармакологических эффектов, исследуемая субстанция обладает метаболическими свойствами и приравнивается к таким препаратам, как мексидол и фенибут.

Мексидол является ингибитором свободнорадикального окисления липидов биомембран, повышает активность антиоксидантных ферментов [11].

Фенибут проявляет себя как ГАМК-эргическое средство, способствующее проведению нервных импульсов в ЦНС. Препарат сочетает в себе метаболические свойства, транквилизирующее, психостимулирующее, антиагрегантное и антиоксидантное действие [12–13].

В связи с этим актуальна разработка методик контроля качества новой эффективной субстанции с доказанными доклиническими, клиническими эффектами с помощью современных методов физико-химического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования нами использована предварительно очищенная и дважды перекристаллизованная в уксусной кислоте, субстанция VMA-10-18.

В работе использовали прибор СФ-56 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) с соответствующим программным обеспечением, весы аналитические ВЛ-124, мерная посуда 1-го класса точности. В качестве растворителя использовали спирт этиловый 96 %, исходя из растворимости субстанции [5].

Методика количественного определения

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 96 %, перемешивали, тем же растворителем доводили до метки и снова перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96 %.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 230 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 96 %.

Содержание действующего вещества в субстанции вычисляли по формуле:

$$X, \% = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
 a – навеска исследуемой субстанции (г); $A_{\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения субстанции VMA-10-18 при длине волны 230 нм.

Валидацию разработанной методики проводили по показателям «Специфичность», «Линейность», «Аналитическая область методики», «Прецизионность», «Правильность» [14, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-спектр исследуемого соединения, представленный на рисунке 1, в области от 220 до 380 нм имеет две полосы поглощения, при длине волны 230 и 255 нм.

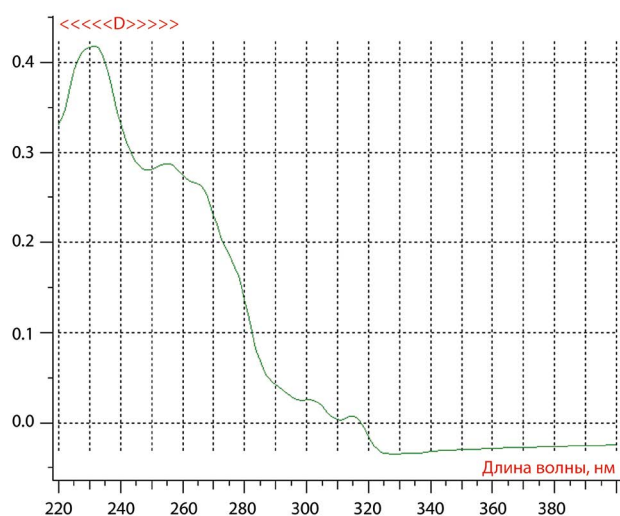


Рисунок 1. УФ-спектр исследуемого соединения VMA-10-18

Figure 1. UV-spectra of substance VMA-10-18

Для определения количественного содержания, приемлемой является длина волны 230 нм, так как она находится в оптимальной области поглощения и является более пологой по сравнению с другим максимумом [15].

Удельный показатель поглощения ($A_{\text{см}}^{1\%}$) раствора 0,0005 % субстанции определяли в пределах концентраций, которые подчиняются закону Бугера – Ламберта – Бера. Полученные результаты были валидированы и представлены в таблице 1.

Данные таблицы говорят об отсутствии систематической ошибки и позволяют использовать данный показатель в расчётах количественного содержания субстанции.

Специфичность методики определяли с помощью анализа модельной смеси (раствора субстанции в спирте этиловом 96 %), анализа образцов после воздействия экстремальных условий. Установлено, что при воздействии на исследуемый образец света, температуры, влажности оптические показатели анали-

зируемого раствора не менялись. При проведении щелочного гидролиза субстанции, оптические показатели раствора также оставались неизменными [16].

Таблица 1. Статистическая обработка результатов определения удельного показателя поглощения исследуемого раствора субстанции VMA-10-18

Table 1. The results of statistical processing specific absorption rate of solution of substance VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, А	Удельный показатель поглощения,	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0506	0,5017	991,5	-5,12	26,1803
2	0,0515	0,5134	996,9	-10,52	110,6003
3	0,0514	0,5087	987,8	-1,42	2,0069
4	0,0506	0,5085	989,3	-2,92	8,5069
5	0,0512	0,4939	964,6	21,78	474,5136
6	0,0508	0,5020	988,2	-1,82	3,3003
					$\Sigma = 625,1083$
Метрологические характеристики					
Среднее значение $\bar{X}$					986,38
Дисперсия (S^2)					125,02
Стандартное отклонение (S)					11,18
Доверительный интервал (Δx)					11,73
Относительная погрешность (ϵ , %)					1,19
Критерий Стьюдента (t)					$1,19 < 2,57(0,95;5)$

Для определения линейности методики использовали диапазонконцентрации от 80 до 120 % [14, 16]. Полученные данные представлены на рисунке 2.

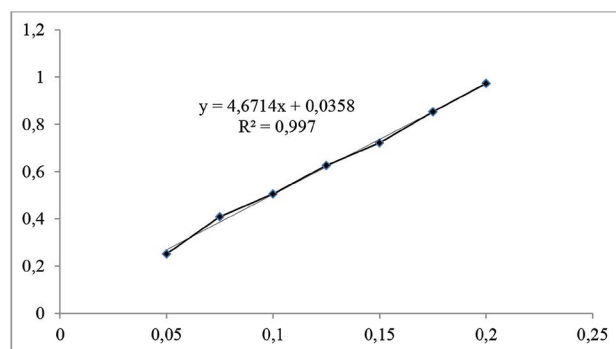


Рисунок 2. График линейной зависимости оптической плотности раствора от содержания субстанции VMA-10-18

Figure 2. Graph of linear dependence of the optical density of the solution on the content of the substance VMA-10-18

Аналитическая область методики находится в диапазоне концентраций от $0,05-0,25 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,997, что соответствует требованиям ГФ XIV издания [14, 16], что подтверждает наличие жесткой линейности графика.

Повторяемость (сходимость) результатов проверяли путем расчёта количественного содержания в 6 повторностях. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости методики количественного определения VMA-10-18

Table 2. The results of determining the precision of the method of quantitative determination VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, А	Найдено, %	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0506	0,5017	99,0	1,08	1,2544
2	0,0515	0,5134	98,3	1,78	3,3124
3	0,0514	0,5087	99,9	0,18	0,0484
4	0,0506	0,5085	101,8	-1,72	2,8224
5	0,0512	0,4939	101,6	-1,52	2,1904
6	0,0508	0,5020	99,9	0,18	0,0336
					$\Sigma = 9,6683$
Метрологические характеристики				$X_{cp} = 100,08$ $SD = 1,55$ $RSD = 1,54\%$	

Стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение методики являются приемлемыми для данного показателя и не превышают 2 % [14, 16].

Правильность методики устанавливали на трех уровнях концентрации в 3 повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики определения количественного содержания субстанции VMA-10-18

Table 3. The results of determining the correctness of the method of quantitative determination of the substance VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, А	Найдено, %	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0374	0,3980	100,3	-0,69	0,4746
2	0,0377	0,3924	99,5	0,11	0,0123
3	0,0373	0,3805	100,5	-0,89	0,7901
4	0,0510	0,4849	98,0	1,61	2,5957
5	0,0507	0,4767	98,6	1,01	1,0223
6	0,0503	0,4939	99,4	0,21	0,0446
7	0,0624	0,6967	100,2	-0,59	0,3468
8	0,0624	0,6820	100,2	-0,59	0,3468
9	0,0626	0,6971	99,8	-0,19	0,0357
					$\Sigma = 5,6689$
Метрологические характеристики				$X_{cp} = 99,611$ $SD = 0,84$ $RSD = 0,845 \%$	

Стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение методики являются приемлемыми для данного показателя и говорят о том, что методика свободна от систематической ошибки [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Произведен выбор оптимальных условий на основе которых разработана методика количественного определения. Установлено, что содержание действующего вещества составляет не менее 98 % и не более 100 %.
2. Разработанная методика валидирована по показателям, рекомендованных Государственной Фармакопеей РФ XIV издания и другой нормативно документацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Янишевский С. Н. Лечение пациентов с сосудистой патологией головного мозга: некоторые решения сложной задачи. *Справочник поликлинического врача*. 2017; 6: 52–56.
2. Барышников Г. А. Профилактика инсульта. *Справочник поликлинического врача*. 2009; 10: 68–74.
3. Скворцова В. И., Шетова И. М., Какорина Е. П., Камкин Е. Г., Бойко Е. Л., Алякин Б. Г., Иванова Г. Е., Шамалов Н. А., Дашьян В. Г., Крылов В. В. Снижение смертности от острых нарушений мозгового кровообращения в результате реализации комплекса мероприятий по совершенствованию медицинской помощи пациентам с сосудистыми заболеваниями в Российской Федерации. *Профилактическая медицина*. 2018; 21(1): 4–10. DOI: 10.17116/profmed20182114-10.
4. Tiwary B. K., Pradhan K., Nandaand A. K., Chakraborty R. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *JChemBioTher*. 2015; 1(1): 104.
5. Мищенко Е. С., Лазарян Д. С. Разработка методик анализа биологически активного соединения группы хиназолин-4(3H)-она: Беликовские чтения. Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции; 07–08 декабря 2017 г; Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России, Пятигорск. *Из-во: Рекламно-информационное агентство на Кавминводах*. 2018; 6: 39–44.
6. Петров В. И., Тюренков И. Н., Озеров А. А. 2014. Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью. Пат. 2507199 Рос. Федерация. № 2012138666/04. Бюл. № 5.
7. Киселева А. В., Чурляев Ю. А., Григорьев Е. В. Роль оксида азота в повреждении нейронов при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2009; 5(5): 80.
8. Закусов В. В., Каверина Н. В., Бендикова Э. А., Буров Ю. В., Мирзоян Р. С., Ганьшина Т. С., Сперанская Н. П., Курочкин И. Г., Жуков В. Н., Салимов Р. М., Борисенко С. А., Цикалова Т. С., Копелевич В. М., Буланова Л. Н., Гунар В. И. 1977. Вазоактивное и ноотропное средство пикамилон. Патент России № 1393428. Бюл. № 17.
9. Ласков В. Б., Поветкин С. В., Чернышков Е. В. Влияние кавинтона форте и пикамилон на когнитивные расстройства у больных дисциркуляторной энцефалопатией. *Клиническая геронтология*. 2009; 15(10-11): 17–21.
10. Avula B., Chittiboyina A. G., Sagi S. R., Wang Y.-H., Wang M., Khan I. A., Cohen P. A. Identification and quantification of vinpocetine and picamilon in dietary supplements sold in the United States. *Drug Test. Analysis*. 2016; 8(3-4): 334–343. DOI: 10.1002/dta.1853.
11. Воронина Т. А. Антиоксидант мексидол. Основные нейротропные эффекты и механизм действия. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2001; 1(1): 2–12.
12. Гитлин И. Г., Дорожко А. И., Иоффе Н. Т., Серебряный В. А., Фокин С. И., Шерешевский А. А. 2010. Способ получения N-никотиноил-γ-аминомасляной кислоты. Патент РФ 2008111785/04; 2008.03.28.
13. Сучков Е. А., Смирнова Л. А., Рябуха А. Ф., Перфилова В. Н. Особенности фармакокинетики производных ГАМК. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012; 41: 172–173.
14. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018: 1814.

15. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. – Л.: Химия. 1986: 432.
16. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [cited 2019 Dec 05]. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/q2_r1___guideline.pdf
7. Kiseleva A. V., Churlyayev Y. A., Grigoryev Y. V. Role of Nitric Oxide in Neuronal Damages in Critical Conditions. *General Reanimatology*. 2009; 5(5): 80 (In Russ.).
8. Zakusov V. V., Kaverina N. V., Bendikov E. A., Burov Yu. V., Mirzoyan R. S., Gan'shina T. S., Speranskaya N. P., Kurochkin I. G., Zhukov V. N., Salimov R. M., Borisenko S. A., Cikalova T. S., Kopelevich V. M., Bulanova L. N., Gunar V. I. 1977. Vasoactive and nootropic medicine picamilon. Russian Federation Patent No. 1393428. Bull. No. 17. (In Russ.).
9. Laskov V. B., Povetkin S. V., Chernyshkov E. V. The influence of cavinton forte and picamilon on cognitive disorders in patients with dyscirculatory encephalopathy. *Clinical gerontology*. 2009; 15(10-11): 17–21 (In Russ.).
10. Avula B., Chittiboyina A. G., Sagi S. R., Wang Y.-H., Wang M., Khan I. A., Cohen P. A. Identification and quantification of vinpocetine and picamilon in dietary supplements sold in the United States. *Drug Test. Analysis*. 2016; 8(3-4): 334–343. DOI: 10.1002/dta.1853.
11. Voronina T. A. Antioxidant Mexidol. The main neuropsychotropic effects and mechanism of action. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2001; 1(1): 2–12. (In Russ.).
12. Gitlin I. G., Dorozhko A. I., Ioffe N. T., Serebryany V. A., Fokin S. I., Shereshevsky A. A. 2010. Process for preparation of N-nicotinoyl-γ-aminobutyric acid. RU patent 2008111785/04; 2008.03.28. (In Russ.).
13. Suchkov E. A., Smirnova L. A., Ryabukha A. F., Perfilova V. N. Pharmacokinetics of GABA derivatives. *Journal of the Volgograd State Medical University*. 2012; 41: 172–173 (In Russ.).
14. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. 2018; 1814. (In Russ.).
15. Bulatov M. I., Kalinkin I. P. Practical Guide of photometric analysis methods. 5th ed. – L.: Chemistry. 1986: 432 (In Russ.).
16. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [cited 2019 Dec 05]. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/q2_r1___guideline.pdf

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-35-38>
УДК 615.014.2



Оригинальная статья/Research article

Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций

С. И. Косенкова^{1*}, И. И. Краснюк¹, И. И. Краснюк (мл.)¹, А. В. Беляцкая¹, О. И. Степанова¹, С. Р. Нарышкин¹

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

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

Статья получена: 11.11.2019. Статья принята к печати: 19.12.2019

Резюме

Введение. На базе кафедр Сеченовского Университета разработан инновационный противогрибковый препарат на основе нафтифина гидрохлорида с комбинацией ПЭГ-400 и ПЭГ-1000. Данный раствор предназначен для наружного применения в качестве противогрибкового препарата. Нафтифин гидрохлорид имеет широкий спектр действия в отношении различных грибов, способных вызывать ониомикозы. ПЭГ входящие в состав разработанной лекарственной формы обуславливают необходимую вязкость раствора (для удерживания в области аппликации), не препятствуют высвобождению ДВ. Нафтифин гидрохлорид имеет выраженный УФ-спектр поглощения с максимумом 256 ± 2 нм, в связи с этим предполагается использование метода УФ-спектрофотометрии для дальнейшей разработки метода количественного определения нафтифина гидрохлорида в исследуемой жидкой лекарственной форме.

Цель. Оценить возможность использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций.

Материалы и методы. Субстанция нафтифина гидрохлорида, ПЭГ-400 и ПЭГ-1000, спирт этиловый 96 %, УФ-спектрофотометрия, фильтр «Миллипор».

Результаты и обсуждение. Проведен комплекс работ на УФ-спектрофотометре, включающий исследования растворов исходной субстанции нафтифина гидрохлорида, растворы ПЭГ, раствор разработанного пролонгированного антимикозного лекарственного средства и его плацебо. Установлена идентичность УФ-спектров действующего вещества в различных средах и доказано сохранение максимум поглощения ДВ, также сохранение зависимости между определенной концентрацией и оптической плотностью раствора. Установлено, что вспомогательные вещества, входящие в состав жидкой лекарственной формы, не влияют на основные характеристики УФ-спектра действующего вещества.

Заключение. Установлена принципиальная возможность использования метода УФ-спектрофотометрии для количественного и качественного анализа инновационного пролонгированного антимикозного лекарственного средства – жидкая лекарственная форма нафтифина гидрохлорида с комбинацией ПЭГ.

Ключевые слова: количественное определение, нафтифина гидрохлорид, полиэтиленгликоль (ПЭГ), УФ-спектрофотометрия, оптическая плотность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы С. И. Косенкова, И. И. Краснюк, И. И. Краснюк (мл.) занимались разработкой эксперимента. С. И. Косенкова, А. В. Беляцкая, О. И. Степанова, С. Р. Нарышкин участвовали в обработке полученных данных. С. И. Косенкова и И. И. Краснюк (мл.) участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении.

Для цитирования: Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Нарышкин С. Р. Оценка возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для разработки количественного определения нафтифина гидрохлорида в его растворе с комбинацией ПЭГ для лечения грибковых инфекций. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 35–38.

Evaluation of the Possibility of Using the Method of UV Spectrophotometry for the Development of Quantitative Determination of Naftifine Hydrochloride in its Solution with a Combination of PEG for the Treatment of Fungal Infections

Svetlana I. Kosenkova^{1*}, Ivan I. Krasnyuk¹, Ivan I. Krasnyuk (jr.)¹, Anastasia V. Belyatskaya¹, Olga I. Stepanova¹, S. R. Naryshkin¹

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

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

Received: 11.11.2019. Accepted: 19.12.2019

Abstract

Introduction. An innovative antifungal agent based on hydrochloride with combination of PEG-400 and PEG-1000 has been developed based at the chairs of Sechenov University. This solution is designated for external application as an antifungal agent. Naftifine hydrochloride has a broad spectrum of action against various fungi capable of causing onychomycosis. PEGs, forming part of the developed dosage form, bring about necessary viscosity of the solution (for retention in application area) and do not prevent drug product performance. Naftifine hydrochloride has an apparent UV absorption band with maximum of 256 ± 2 nm, in connection with this, it is supposed to use the UV spectrophotometry method for further development of quantitation method of naftifine hydrochloride detection in tested oral liquid.

© Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Нарышкин С. Р., 2020

© Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Naryshkin S. R., 2020

Aim. To evaluate the feasibility of using the UV spectrophotometry method for development of quantitation of naftifine hydrochloride in its solution with a combination of PEG for mycotic infection treatment.

Materials and methods. The substance of naftifine hydrochloride, PEG-400 and PEG-1000, ethyl alcohol 96 %, UV spectrophotometry, «Millipore» filter.

Results and discussion. A set of operations was carried out with UV spectrophotometer, including trials of solutions of initial substance of naftifine hydrochloride, PEG solutions, a solution of developed prolonged antimycotic drug and its placebo. The identity of UV spectra of the actual substance in various media was determined, maximum absorption of actual substance and dependence preservation between specified concentration and optical density of the solution were proved. It was found that auxiliary substances included in liquid dosage form do not affect the main characteristics of the UV spectrum of actual substance.

Conclusion. The possibility in principle of using the UV spectrophotometry method for quantitative and qualitative analysis of innovative prolonged antimycotic drug – liquid dosage form of naftifine hydrochloride with a combination of PEG has been established.

Keywords: quantitation, naftifine hydrochloride, polyethylenglycol (PEG), UV spectrophotometry, optical density.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (jr.) were engaged in development of experiment. Svetlana I. Kosenkova, Anastasia V. Belyatskaya, Olga I. Stepanova, R. S. Naryshkin took part in the processing of the received data. Svetlana I. Kosenkova, Ivan I. Krasnyuk (jr.) participated in the writing of the text of the article. All authors participated in the discussion.

For citation: Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Naryshkin S. R. Evaluation of the possibility of using the method of UV spectrophotometry for the development of quantitative determination of naftifine hydrochloride in its solution with a combination of PEG for the treatment of fungal infections. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 35–38.

ВВЕДЕНИЕ

Значительный рост грибковых заболеваний связан с образом жизни, нарушением соблюдения правил гигиены, сопутствующих заболеваний (сахарный диабет), пожилой возраст пациентов [1]. Поэтому разработка новых антимикозных препаратов актуальна. Для внедрения в практику новых лекарственных препаратов необходимо проводить ряд исследований, в.ч. количественное определение содержания действующего вещества. Был разработан новый состав пролонгированного антимикозного препарата, содержащий нафтифин гидрохлорид и комбинацию полиэтиленгликолей (ПЭГ) с массой до 400 г/моль и 1000 г/моль. Данный состав обладает рядом преимуществ: высокой вязкостью и пролонгированностью действия. Дальнейшим этапом в разработке ЖЛФ является разработка метода количественного определения нафтифина гидрохлорида в присутствии используемых вспомогательных веществ. Нафтифин гидрохлорид имеет выраженный УФ-спектр поглощения с максимум 256 ± 2 нм, в связи с этим предполагается использование метода УФ-спектрофотометрии для дальнейшей разработки метода количественного определения нафтифина гидрохлорида в исследуемой жидкой лекарственной форме.

В связи с этим представляется актуальным метод УФ-спектрофотометрии. Данный метод широко используется в фармацевтическом анализе. Преимущество этого метода в том, что для эксперимента затрачивают небольшое количество вещества, и техника проведения исследования достаточно проста. Результаты, полученных данных в результате опыта, могут быть достаточно информативны. Предполагаемый, к использованию УФ-спектрофотометр, состоит на оснащение большинства химических, контрольно-аналитических и технологических лабораторий. Прибор состоит из источника излучения, призмы, щели для

выделения полосы длины волны, кюветы для образцов, с толщиной слоя 10 мм, детектора излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы. Данный метод основан на получении и исследовании спектров испускания, а также поглощения в УФ-области. Для исследуемого раствора рабочая область составляет 190–500 нм. Определение концентрации вещества методом УФ-спектрофотометрии основано на законе Бугера – Ламберта – Бера [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод УФ-спектрофотометрии проводили на базе кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Использовали прибор UNICO 2800 из серии сканирующих спектрофотометров UNICO 280X Spectro Quest (США), также использовали кварцевые кюветы с толщиной слоя 10,0 мм.

В работе использовали действующее вещество нафтифин [не менее 99 % основного вещества, Arcos Organic (Бельгия) серия № A0362535, срок годности до 03.03.2020] (рисунок 1).

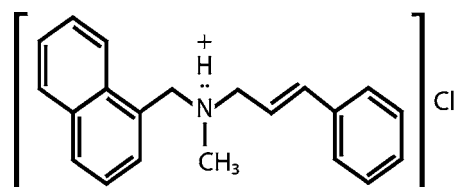


Рисунок 1. Формула нафтифина гидрохлорида

$C_{21}H_{21}N$, (E)-N-Метил-N-(3-фенил-2-пропенил)-1-нафталинметанамин. 323,86 г/моль

Figure 1. Naphthyphine hydrochloride formula

$C_{21}H_{21}N$, (E)-N-Methyl-N-(3-phenyl-2-propenyl)-1-naphthalene-methanamine. 323.86 g/mol

Нафтифин гидрохлорид представляет собой белый кристаллический порошок без запаха, практически нерастворимый в воде, легко растворимый в ацетоне, растворимый в спирте 95 %. Температура плавления 171–175 °С.

Нафтифин гидрохлорид чувствителен к высоким температурам и должен храниться при температуре 2–8 °С в плотно закупоренной таре, защищенным от света месте.

ПЭГ-400, ПЭГ-1000

$\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, $n \approx 33 - 68$. ПЭГи от Merck (Германия).

ПЭГ-400 – прозрачная, вязкая жидкость, без запаха и вкуса. ПЭГ-1000 пастообразное вещество, белого цвета, без запаха и вкуса. Плотность 1,13 г/мл. ПЭГи достаточно легко растворимы в воде, хлороформе, алифатических кетонах, спиртах и других органических соединениях, но абсолютно нерастворимы в эфирах. Температура плавления 65–72 °С. ПЭГи хранятся в хорошо закупоренной таре, прохладном и защищенном от света месте.

Спирт этиловый 95 % (х.ч.) (ГФ XIV, ФС.2.1.0036.15)

Прозрачная жидкость, обладает летучими и горючими свойствами. Обладает высокой растворяющей способностью, за счет чего часто используется в фармацевтической отрасли в качестве растворителя. Плотность 0,8014 г/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Поскольку в состав разработанного инновационного противогрибкового препарата в качестве действующего вещества входит нафтифин гидрохлорид – вещество, молекула которого имеет выраженный УФ-спектр, для его количественного и качественного анализа, теоретически можно использовать метод спектрофотометрии в УФ-области. Количественное определение возможно на основании закона Бугера – Ламберта – Бера.

В качестве объекта исследования использовали раствор в состав, которого входит: субстанция нафтифина гидрохлорида – 0,5 г; спирт этиловый – 96 %: 8,0 г; ПЭГ-400 – 33,20 г; ПЭГ-1000 – 8,30 г [4].

Раствор для исследований готовили следующим образом. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 0,5 г субстанции нафтифина гидрохлорида, субстанцию растворяли в 8,0 г (10 мл) спирта этилового 95 %. Колбу ставили на магнитную мешалку и перемешивали до полного растворения нафтифина гидрохлорида. После растворения в полученный спиртовой раствор нафтифина вносили ПЭГ-400 33,20 г (21 мл) и ПЭГ-1000 8,30 г (5,25 мл), вновь перемешивали до полного растворения ПЭГ-1000. Раствор фильтровали через фильтр «Миллипор» с размером пор 0,45 мкм.

Для того, чтобы исключить влияние вспомогательных веществ на УФ-спектр испытуемого раствора измерение его оптической плотности, необходимо осуществлять, используя в качестве раствора – сравнения состав вспомогательных веществ в аналогичной, испытуемому раствору концентраций. Отдельно готовили раствор вспомогательных веществ. В мерный стакан вместимостью 5000 мл помещали: 587,14 г ПЭГ-1000; 3001,4 г ПЭГ-400; 686,9 г этанола 96 % (в соотношении смесь по массе 1,00:5,11:1,14). Перемешивали до получения раствора и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

Далее готовили испытуемый раствор. 1 мл исследуемого раствора нафтифина гидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили объем раствора составом вспомогательных веществ до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм или бумажным фильтром, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. Раствор использовали свежеприготовленным.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию нафтифина гидрохлорид [серия № A0362535, Arcos Organic (Бельгия) срок годности до 03.03.2020]. Раствор стандартного образца готовили следующим образом: 1,38 г (точная навеска) нафтифина гидрохлорида [серия № A0362535, Arcos Organic (Бельгия) срок годности до 03.03.2020] помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл раствора вспомогательных веществ в концентрации, аналогично исследуемому раствору, встряхивали в течение 5 мин, доводили объем раствором вспомогательных веществ до метки и перемешивали. Из полученного раствора отбирали 1 мл и помещали в мерную колбу вместимостью 2000 мл, доводили объем раствора составом вспомогательных веществ до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Измеряли оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца на УФ-спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 256 ± 2 нм в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ в аналогичной, испытуемому раствору концентраций.

Содержание нафтифина гидрохлорида в одном миллилитре испытуемого раствора в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a_0 \cdot P \cdot A \cdot 1000 \cdot a \cdot 100 \%}{100 \cdot 2000 \cdot A_0 \cdot G} = \frac{a_0 \cdot P \cdot A \cdot 1000 \cdot 1 \cdot 100}{100 \cdot 2000 \cdot A_0 \cdot 0,0138} = \frac{a_0 \cdot P \cdot A}{A_0 \cdot 0,0276},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца нафтифина гидрохлорида; a_0 – навеска стандартного образца нафтифина гидрохлорида, в граммах; a – объем испытуемого раствора, в миллилитрах (1 мл); G – нормативное содержание нафтифина гидрохлорида

да в 1 мл испытуемого раствора, в граммах (0,0138 г); P – содержание основного вещества в стандартном образце нафтифина гидрохлорида, в долях единицы.

Содержание нафтифина гидрохлорида в разработанном исследуемом растворе, должно быть $1,00 \pm 0,03$ %.

Метод УФ-спектрофотометрии также может быть использован и для качественного анализа разработанной лекарственной формы. Наличие максимума поглощения 256 ± 2 нм на УФ-спектре испытуемого раствора свидетельствует о присутствии нафтифина гидрохлорида в его составе. Валидация не проводилась, в связи с тем, что целью работы была оценка теоретической возможности использования метода УФ-спектрофотометрии для проведения качественного и количественного определения раствора нафтифина гидрохлорида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По совокупности результатов, полученных в эксперименте установлена принципиальная возможность использования метода УФ-спектрофотометрии для количественного и качественного анализа инновационной пролонгированной антимикотической лекарственной формы – ЖЛФ нафтифина гидрохлорид с комбинацией ПЭГ. Теоретически данный метод позволяет быстро и достаточно просто доказать наличие действующего вещества (нафтифина гидрохлорида). При наличии остальных вспомогательных

веществ, действующее вещество однозначно определяется на УФ-спектре по наличию максимуму поглощения 256 ± 2 нм. Количественное определение возможно на основании закона Бугера – Ламберта – Бера. В качестве раствора сравнения используют раствор вспомогательных веществ в аналогичной, испытуемому раствору концентраций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: БИНОМ-Пресс. 2003: 440.
2. ОФС.1.2.1.1.0003.15. Спектрофотометрия в УФ и видимой областях. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2018.
3. Сергеев Ю. В., Шпигель Б. И., Сергеев А. Ю. Фармакотерапия микозов. – М.: Медицина для всех. 2003: 200.
4. Патент РФ 2699653. Средство для лечения микоза ногтей. Косенкова С. И., Краснюк И. И., Краснюк И. И. (мл.), Беляцкая А. В., Степанова О. И., Фатеева Т. В. Сеченовский Университет. Оpubл. 09.09.2019.

REFERENCES

1. Sergeev A. Yu., Sergeev Yu. V. Fungal infections. A guide for physicians. – M.: BINOM-Press. 2003: 440 (In Russ.).
2. OFS.1.2.1.1.0003.15. Spectrophotometry in the UV and visible regions". State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. – M.: Scientific center for examination of medical applications. 2018 (In Russ.).
3. Sergeev Y. V., Spiegel B. I., Sergeev A. Yu. Pharmacotherapy of fungal infections. – M.: Medicine for all. 2003: 200 (In Russ.).
4. Patent 2699653 of the Russian Federation Remedy for the treatment of nail mycosis. Kosenkova S. I., Krasnyuk I. I., Krasnyuk I. I. (jr.), Belyatskaya A. V., Stepanova O. I., Fateeva T. V. Sechenov University. Publ. 09.09.2019 (In Russ.).

12 МАРТА
КОНГРЕСС-ЦЕНТР «ЦМТ»

INOPharma
*Первые в космосе -
Первые в фарме!*
2020

**МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО ИННОВАЦИЯМ И
ТЕХНОЛОГИЯМ В ОБЛАСТИ
ФАРМАЦЕВТИКИ И МЕДИЦИНЫ**

В ЧИСЛЕ ТЕМ:
Инновационные решения в ядерной медицине
Персонализированная медицина
Взаимодействие науки и бизнеса в целях создания
инноваций

**БУДЬ В
ФАРМТРЕНДЕ!**

<http://inopharma.ru/>

Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной

О. В. Тринеева^{1*}, А. А. Гудкова¹, М. А. Рудая¹

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

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

Статья получена: 11.12.2019. Статья принята к печати: 16.01.2020

Резюме

Введение. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides*), семейства Лоховые (*Eleagnaceae*) – перспективный источник биологически активных веществ, традиционным сырьем которого являются плоды. В существующей нормативной документации (НД) отсутствует такой показатель подлинности и доброкачественности плодов как «микроскопия». Несмотря на имеющиеся данные по анатомии и гистологии плодов данного вида лекарственного растительного сырья (ЛРС), в научной литературе не описаны особенности люминесценции тканей плодов облепихи крушиновидной. Известно, что люминесцентные особенности тканей позволяют выявлять локализацию биологически активных структур, а также, в некоторых случаях, проводить селективную диагностику ЛРС.

Цель. Целью настоящей работы являлось изучение особенностей люминесценции тканей высушенных измельченных плодов облепихи крушиновидной, а также оптимизация условий проведения анализа.

Материалы и методы. Объектом исследования служили высушенные измельченные плоды облепихи крушиновидной различных сортов. Изучение микродиагностических признаков проводили согласно ГФ XIV РФ ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Стереомикроскопическое исследование осуществляли на микроскопе Биомед-6. Люминесценцию тканей плодов облепихи крушиновидной исследовали с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед-3 Люм.

Результаты и обсуждение. Наиболее выраженное желтое свечение наблюдается для тканей мякоти и эпидермиса плода, что связано с наибольшим содержанием в данных структурах жирного масла. Зеленоватый оттенок объектам придают, содержащиеся наряду с маслом, группы фенольных соединений, а коричневатый оттенок – конденсированные танины. Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски, не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочленения пластинок волоска. Стенки звездчатых волосков обладают слабым зеленоватым свечением. Фрагменты собственной плода («мешочек») коричневатого цвета без собственной люминесценции, также как и кожура семени. Зародыш обладает собственной люминесценцией зеленоватого цвета ввиду наличия как жирного масла, так и комплекса запасных веществ.

Заключение. Впервые проведен люминесцентный анализ плодов облепихи крушиновидной. Экспериментально обоснован выбор способа подготовки исследуемого ЛРС к проведению микроскопического исследования. Проведенный люминесцентный анализ позволил выявить особенности свечения тканей плодов облепихи крушиновидной. Уточнены основные микродиагностические признаки измельченных плодов облепихи крушиновидной высушенных и их биометрические характеристики. Анализ полученных данных позволит в дальнейшем разработать раздел «Микроскопические признаки» для включения в проект ФС на ЛРС, широко культивируемое и используемое отечественной фармацевтической промышленностью для производства лекарственных растительных препаратов.

Ключевые слова: облепиха крушиновидная, люминесцентный анализ, анатомо-диагностические признаки, биометрические характеристики.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. М. А. Рудая осуществляла заготовку и сушку образцов сырья, а также пробоподготовку к проведению анализа. А. А. Гудковой проведены исследования анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной с применением люминесцентного анализа, а также обозначены все рисунки, отражающие основные результаты работы. О. В. Тринеева написала текст статьи, в том числе заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Тринеева О. В., Гудкова А. А., Рудая М. А. Применение люминесцентной микроскопии в анализе анатомо-диагностических признаков плодов облепихи крушиновидной. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 40–45.

Application of Luminescent Microscopy in Analysis of Anatomic-diagnostic Signs of Fruits of Sea Buckthorn

Olga V. Trineeva^{1*}, Alevtina A. Gudkova¹, Margarita A. Rudaya¹

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

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

Received: 11.12.2019. Accepted: 16.01.2020

Abstract

Introduction. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*), the family *Eleagnaceae* – a promising source of biologically active substances, the traditional raw materials of which are fruits. The existing regulatory documentation (ND) lacks such an indicator of the authenticity and good quality of the fruit as «microscopy». Despite the available data on the anatomy and histology of the fruits of this type of medicinal plant material (MPM), the scientific literature does not describe the luminescence features of the tissues of sea buckthorn fruit. It is known that the luminescent features of tissues make it possible to identify the localization of biologically active structures, and also, in some cases, to conduct selective diagnosis of MPM.

Aim. The aim of this work was to study the characteristics of the luminescence of the tissues of dried crushed fruits of sea buckthorn, and also to optimize the conditions for analysis.

© Тринеева О. В., Гудкова А. А., Рудая М. А., 2020

© Trineeva O. V., Gudkova A. A., Rudaya M. A., 2020

Materials and methods. The object of the study was the dried, crushed fruits of sea buckthorn of various species. The study of microdiagnostic signs was carried out according to the State Pharmacopoeia of the XIV RF GPA.1.5.3.0003.15 «Technique of microscopic and microchemical studies of medicinal plant materials and herbal medicines». A stereomicroscopic study was carried out on a Biomed-6 microscope. The luminescence of sea buckthorn fruit tissues was examined using a luminescent microscope of the Micromed-3 Lum brand.

Results and discussion. The most pronounced yellow glow is observed for the tissue of the pulp and epidermis of the fetus, which is associated with the highest content of fatty oil in these structures. Groups of phenolic compounds contained along with oil give a greenish tint to objects, while condensed tannins give a brownish tint. The plates that make up the corymbose hairs do not exhibit bright luminescence; a weak glow is characteristic of the joints of the hair platelets. The walls of stellate hairs have a faint greenish glow. Fragments of the actual fruit («sac») are brownish in color, without their own luminescence, as well as the seed peel. The embryo has its own greenish luminescence due to the presence of both a fatty oil and a complex of storage substances.

Conclusion. The luminescent analysis of sea buckthorn fruits was carried out for the first time. The choice of a method for preparing the studied MPM for microscopic examination is experimentally substantiated. The luminescent analysis revealed the peculiarities of the glow of the tissues of the fruits of sea buckthorn. The main microdiagnostic signs of crushed dried sea buckthorn fruits and their biometric characteristics are specified. The analysis of the obtained data will allow us to further develop the section «Microscopic signs» for inclusion in the PA project on MPM, widely cultivated and used by the domestic pharmaceutical industry for the production of herbal medicines.

Keywords: sea buckthorn, luminescent analysis, anatomical and diagnostic features, biometric characteristics.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Margarita A. Rudaya carried out the procurement and drying of raw material samples, as well as sample preparation for analysis. Alevtina A. Gudkova conducted research on the anatomical and diagnostic features of sea buckthorn fruits using luminescence analysis, and also indicated all the figures reflecting the main results of the work. Olga V. Trineeva wrote the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Trineeva O. V., Gudkova A. A., Rudaya M. A. Application of luminescent microscopy in analysis of anatomic-diagnostic signs of fruits of sea buckthorn. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 40–45.

ВВЕДЕНИЕ

Люминесценция – свойство вещества излучать свет под воздействием возбуждающих факторов, как правило, без повышения температуры. Люминесцентный метод исследования, отличающийся высокой чувствительностью и быстротой, находят все более широкое применение в практике фармацевтического анализа. Чувствительность люминесцентных методов исключительно велика. Они позволяют обнаружить сто миллиардные доли грамма люминесцирующего вещества, что во много раз превосходит чувствительность химического и абсорбционного методов. Кроме того, люминесцентный анализ полностью отвечает требованиям экспресс-метода. Для возбуждения люминесценции используют ультрафиолетовые лучи. При этом происходит поглощение коротковолнового ультрафиолетового излучения исследуемым веществом с последующим испусканием лучей с большей длиной волны (свечение исследуемого объекта). Метод давно используется для контроля качества продуктов питания. Разница между микроскопией в проходящем свете и флуоресценцией заключается в том, что в последнем случае препарат рассматривается в излучаемом им свете. При этом химический состав клеток и тканей влияет на качество люминесценции и люминесцентная микроскопия в определенной мере является гистохимическим исследованием. Лишь немногие биологически значимые вещества имеют выраженную собственную люминесценцию в видимой области спектра. К ним относятся некоторые пигменты (хлорофилл, порфирины, липохромы), витамины А и В₂, алкалоиды (берберин, хинин и др.), антибиотики (тетрациклины и др.), химиотерапевтические и токсические вещества. Преимуществами люминесцентной микроскопии являются: цветное изображе-

ние; высокая степень контрастности самосветящихся объектов на черном фоне; возможность исследования как прозрачных, так и непрозрачных живых объектов; возможность исследования различных жизненных процессов в динамике их развития; обнаружение и установление локализации отдельных микробов и вирусов; развитие тончайших методов цито- и гистохимии и экспресс-диагностика.

Подтверждение подлинности лекарственного растительного сырья (ЛРС) в процессе его стандартизации – одна из важнейших задач современной фармакогнозии. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides*), семейства Лоховые (*Eleagnaceae*) – перспективный источник биологически активных веществ, традиционным сырьем которого являются плоды. Химический состав плодов облепихи представлен, в первую очередь, жирным маслом, богатым каротиноидами, токоферолами, фосфолипидами, эссенциальными жирными кислотами, витаминами различных групп (С, В₁, В₂, РР), органическими кислотами, сахарами, флавоноидами, аминокислотами, дубильными и другими биологически активными веществами [1, 2]. В настоящее время плоды в промышленных масштабах используются для производства облепихового масла и препаратов на его основе, что, согласно принципам сквозной стандартизации, требует обязательного наличия современной нормативной документации (НД) на исходное сырье – ФС. Стандартизация плодов облепихи проводится в соответствии с требованиями временной фармакопейной статьи (ВФС) 42-1741-87 (свежие плоды) и ТУ 64-472-88 (сухие плоды) [2]. Государственные фармакопеи с X по XIV изданий не содержат статей на данный вид сырья [3, 4]. В существующей НД отсутствует такой показатель подлинности и доброкачественности плодов как «микроскопия». Поэтому исследования по разработке показателей ка-

чества данного вида ЛРС, в частности, микродиагностических признаков, для включения в проекты ФС является весьма актуальными.

Несмотря на имеющиеся данные по анатомии и гистологии плодов данного вида ЛРС [5–8], в научной литературе не описаны особенности люминесценции тканей плодов облепихи крушиновидной. Известно, что люминесцентные особенности тканей позволяют выявлять локализацию биологически активных структур, а также, в некоторых случаях, проводить селективную диагностику ЛРС [9–12].

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей люминесценции тканей высушенных измельченных плодов облепихи крушиновидной, а также оптимизация условий проведения анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили плоды облепихи крушиновидной различных сортов («Трофимовская», «Студенческая», «Ботаническая ароматная», «Красно-карминовая», «Нивелена», «Столичная», «Галерит», «Рябиновая», «Ботаническая любительская», «Ботаническая»), заготовленные на территории Ботанического сада биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет» им. М. В. Ломоносова в сентябре 2018 года, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп. Сушку плодов производили при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 14 %. Макроскопическое исследование плодов осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0007.15 ГФ XIV «Плоды» [4]. Изучение микродиагностических признаков проводили согласно ГФ XIV РФ ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Стереомикроскопическое исследование осуществляли на микроскопе Биомед-6 (Россия). Люминесценцию тканей плодов облепихи крушиновидной исследовали с использованием люминесцентного микроскопа марки Микромед-3 Люм (Россия), оснащенного корпусом люминесцентной насадки с четырьмя люминесцентными блоками «В»; «G»; «V» и «UV» LED (Россия). Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (100 Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр – 410–490 нм, наблюдение в диапазоне 515–700 нм (Лаборатория Фитониринга ФГБОУ ВО ВГУ). Визуализацию диагностических признаков осуществляли с помощью видеокамеры Livenhuk C310 NG (КНР) и программным обеспечением Top View (x86).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным методом определения подлинности ЛРС является микродиагностический анализ. Данный вид анализа отличается высокой информативностью и простотой выполнения. Исследованию подвергали высушенное измельченное сырье без дополнительной обработки.

При рассмотрении с помощью лупы или стереомикроскопа измельченные плоды облепихи представляют собой кусочки разного размера, проходящие сквозь сито с размером отверстий 7 мм, состоящие из фрагментов гипантия, сильно морщинистые коричневато-бурого или красновато-коричневого цвета. Поверхность гипантия покрыта щитковидными волосками желтоватого цвета, которые также могут быть отломаны и встречаться отдельно от гипантия. Визуализируемые фрагменты стенок плода представлены в виде «мешочка» с тонкими стенками. Косточки вытянутой формы, мелкие, твердые, встречаются в основном в цельном виде, черного или темно-коричневого цвета.

Порошок облепихи крушиновидной плодов представляет собой смесь частей гипантия, тканей собственно плода и косточек, разной формы и размеров, но проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Цвет порошка преимущественно коричневато-бурый или красновато-коричневый с белыми, черными и буровато-желтыми вкраплениями. Порошок, как и измельченные плоды облепихи маслянистые на ощупь и сильно комкуются при сжатии. Запах своеобразный, вкус водного извлечения кисловато-сладкий.

Следует отметить, что микроскопирование высушенных плодов облепихи значительно затрудняется из-за наличия в плодах жирного масла. При высушивании значительно увеличивается доля жирного масла в плодах. В связи с этим, измельченное сырье и порошок плодов подвергаются комкованию, что затрудняет проведение как стереомикроскопического, так и люминесцентного анализа, ввиду образования объемного агломерата частичек сырья (рисунок 1, А). Для удаления жирного масла было использовано выдерживание измельченного и порошоканного сырья в гексане в течение суток с последующим отгоном растворителя и высушиванием объектов (рисунок 1, Б).

Следует отметить, что достоверных отличий в выявленных микроскопических признаках и их биометрических характеристиках между различными исследуемыми сортами плодов выявлено не было, по-

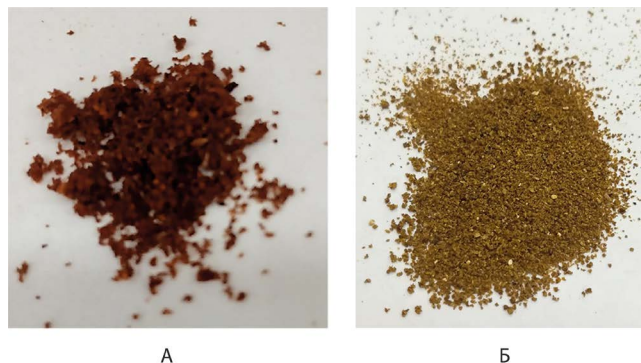


Рисунок 1. Плоды облепихи крушиновидной высушенные измельченные:

А – до обработки гексаном; **Б** – после обработки гексаном

Figure 1. Dried shredded buckthorn fruits of sea buckthorn:

А – before treatment with hexane; **Б** – after treatment with hexane

этому дальнейшее описание проведено без соотнесения признаков – сорт. Проводя люминесцентный анализ порошка облепихи крушиновидной плодов высушенных следует отметить наличие автофлуоресценции всех фрагментов, имеющих в поле зрения, за исключением кожуры семени (рисунок 2, А). Наиболее выраженное желтое свечение наблюдается для тканей мякоти и эпидермиса плода, что связано с наибольшим содержанием в данных структурах жирного масла (рисунок 3). При этом, люминесценция настолько яркая, что проведение анализа без использования нейтрального светофильтра, гасящего свечение затруднительно. Зеленоватый оттенок объектам придают, содержащиеся наряду с маслом, группы фенольных соединений (флавоноиды, антоцианы), а коричневатый оттенок – конденсированные танины [9–16]. Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочленения пластинок волоска (рисунок 3, А и Б). Стенки звездчатых волосков обладают слабым зеленоватым свечением. Фрагменты собственно плода («мешочек») коричневатого цвета, без собственной люминесценции, также как и кожура семени (представлена темным образованием, рисунок 3, А). Зародыш обладает собственной люминесценцией зеленоватого цвета (ввиду наличия как жирного масла, так и белковых соединений) (рисунок 2, Б).

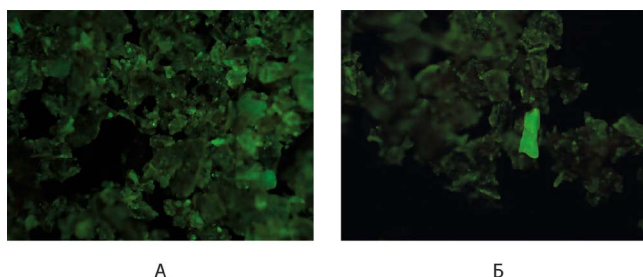


Рисунок 2. Автолюминесценция облепихи крушиновидной плодов высушенных, (при облучении с $\lambda = 410 - 490$ нм) ув. x40: А – общий вид; Б – фрагмент зародыша

Figure 2. Autoluminescence of sea buckthorn, buckthorn-dried fruits, (upon irradiation with $\lambda = 410 - 490$ nm) uv. x40: А – is a general view; Б – a fragment of the embryo

Необходимо отметить положительное влияние подобной пробоподготовки на растительное сырье, заключающееся в повышении информативности анализа ввиду практически полного отсутствия комковатости и увеличения сыпучести порошка. Также нужно подчеркнуть усиление люминесценции тканей. Благодаря удалению масла улучшается визуализация и отнесение фрагментов к той или иной морфологической части. В частности, это относится к звездчатым волоскам (рисунок 4), собственно плоду («мешочку»), а также стали различимы фрагменты эпидермиса гипантия и тканей мякоти (рисунок 5), более отчетливо видны щитковидные волоски (рисунок 6).

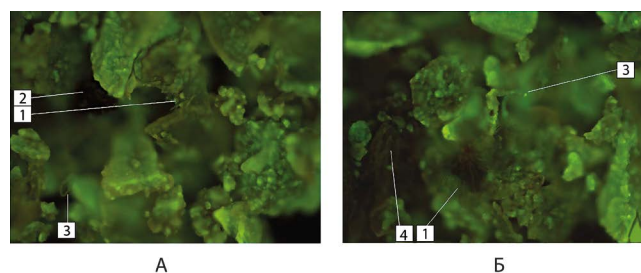


Рисунок 3. Автолюминесценция облепихи крушиновидной плодов высушенных, (при облучении с $\lambda = 410 - 490$ нм) ув. x100 (с приглушением свечения):

1 – щитковидный волосок; 2 – фрагмент кожуры семени; 3 – фрагмент звездчатого волоска; 4 – фрагмент собственно плода

Figure 3. Autoluminescence of sea buckthorn, buckthorn-shaped fruits, dried (upon irradiation with $\lambda = 410 - 490$ nm) uv. x100 (with muting):

1 – corymbose hair; 2 – fragment of the peel of the seed; 3 – fragment of the stellate hair; 4 – fragment of the actual fetus

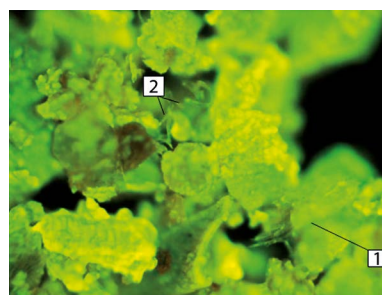


Рисунок 4. Автолюминесценция облепихи крушиновидной плодов высушенных, (при облучении с $\lambda = 410 - 490$ нм) ув. x100:

1 – щитковидный волосок; 2 – звездчатый волосок

Figure 4. Autoluminescence of sea buckthorn, buckthorn-dried fruits, (upon irradiation with $\lambda = 410 - 490$ nm) uv. x100:

1 – corymbose hair; 2 – star hair

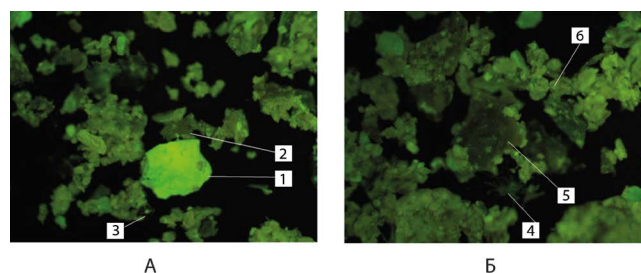


Рисунок 5. Люминесценция облепихи крушиновидной плодов высушенных, после обработки гексаном (при облучении с $\lambda = 410 - 490$ нм), ув. x40:

1 – фрагмент зародыша; 2 – фрагмент собственно плода; 3 – фрагмент кожуры семени; 4 – звездчатые волоски; 5 – фрагмент эпидермиса гипантия; 6 – фрагмент мякоти

Figure 5. Luminescence of sea buckthorn, buckthorn-dried fruit, after treatment with hexane (when irradiated with $\lambda = 410 - 490$ nm), uv. x40:

1 – a fragment of the embryo; 2 – a fragment of the actual fetus; 3 – a fragment of the peel of the seed; 4 – stellate hairs; 5 – a fragment of the epidermis hypanthium; 6 – a piece of pulp

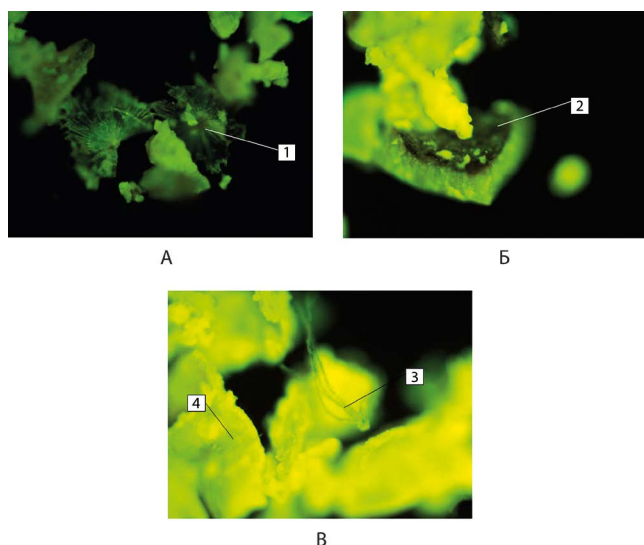


Рисунок 6. Люминесценция облепихи крушиновидной плодов высушенных, после обработки гексаном (при облучении с $\lambda = 410 - 490$ нм), ув. $\times 100$:

А – с применением нейтрального светофильтра; Б, В – без тушения люминесценции. 1 – щитковидные волоски; 2 – палисадная ткань кожуры семени; 3 – фрагмент семени; 4 – звездчатые волоски; 5 – щитковидные волоски

Figure 6. Luminescence of sea buckthorn, buckthorn-dried fruits, after treatment with hexane (when irradiated with $\lambda = 410 - 490$ nm), UV. $\times 100$:

А – using a neutral light filter; Б, В – without quenching of luminescence. 1 – corymbose hairs; 2 – palisade tissue of the seed peel; 3 – a fragment of the seed; 4 – stellate hairs; 5 – corymbose hairs

В таблице 1 и на рисунке 7 приведены результаты экспериментальных исследований биометрических характеристик основных микроскопических признаков плодов облепихи крушиновидной.

Таблица 1. Результаты определения биометрических характеристик основных микроскопических признаков плодов облепихи крушиновидной методом люминесцентной микроскопии

Table 1. The results of determining the biometric characteristics of the main microscopic features of buckthorn buckthorn fruits by luminescent microscopy

№ п/п	Анатомо-диагностический признак, мкм	Экспериментальные данные
1	Диаметр щитковидных волосков	145–566
2	Диаметр ножек (место прикрепления волосков)	28–92
3	Клетки эпидермиса гипантия	Длина (23–58) Ширина (3–46)
4	Звездчатые волоски	Длина (1329) Толщина (30)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые проведён люминесцентный анализ плодов облепихи крушиновидной как перспективного источника биологически активных

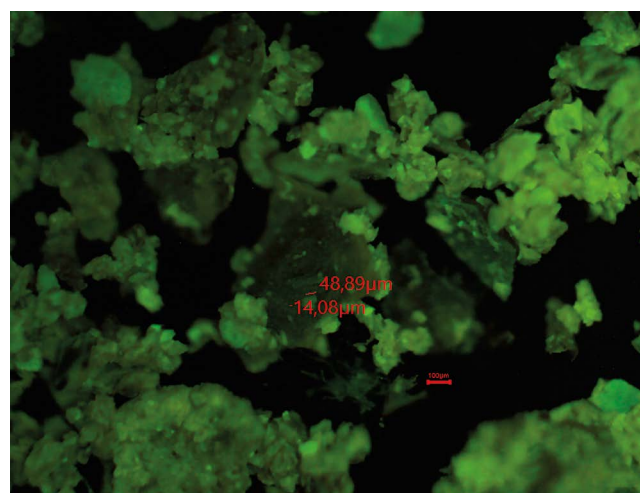


Рисунок 7. Биометрические характеристики основных микроскопических признаков плодов облепихи крушиновидной методом люминесцентной микроскопии (на примере клеток эпидермиса гипантия)

Figure 7. Biometric characteristics of the main microscopic features of buckthorn buckthorn fruits by luminescent microscopy (for example, epidermal hypanthium cells)

соединений. Экспериментально обоснован выбор способа подготовки исследуемого сырья к проведению микроскопического исследования. Проведенный люминесцентный анализ позволил выявить особенности свечения тканей плодов облепихи крушиновидной. Уточнены основные микродиагностические признаки измельченных плодов облепихи крушиновидной высушенных и их биометрические характеристики. К диагностичным люминесцентным особенностям следует отнести:

- Наиболее выраженное желтое свечение наблюдается для тканей мякоти и эпидермиса плода, что связано с наибольшим содержанием в данных структурах жирного масла.

- Пластинки, из которых состоят щитковидные волоски не обладают яркой люминесценцией, слабое свечение характерно для мест сочленения пластинок волоска.

- Стенки звездчатых волосков обладают слабым зеленоватым свечением.

- Фрагменты собственно плода («мешочек») коричневатого цвета, без собственной люминесценции, также как и кожура семени (представлена темным образованием).

- Зародыш обладает собственной люминесценцией зеленоватого цвета (ввиду наличия как жирного масла, так и белковых соединений).

Анализ полученных данных позволит в дальнейшем разработать раздел «Микроскопические признаки» для включения в проект ФС на лекарственное растительное сырье, широко культивируемое и используемое отечественной фармацевтической промышленностью для производства лекарственных растительных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букштынов А. Д., Трофимов Т. Т., Ермаков Б. С. и др. Облепиха. М.: Изд-во «Лесная промышленность». 1978: 192.
2. Тринеева О. В. Комплексное исследование содержания и специфического профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной. Воронеж: Издательский дом ВГУ. 2016: 224.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание. 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
5. Рудая М. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И., Даньшина И. А. Изучение диагностических признаков плодов облепихи различных сортов. *Фармация*. 2017; 66(7): 11–15.
6. Рудая М. А., Тринеева О. В., Гудкова А. А., Сливкин А. И., Бойко Г. А., Даньшина И. А. Плоды облепихи крушиновидной: морфолого-анатомические признаки различных сортов. *Фармация*. 2018; 67(2): 21–26.
7. Тринеева О. В., Шкунова Н. С., Мальцева А. А., Сливкин А. И. Исследование микроскопических признаков высушенных плодов облепихи крушиновидной. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2014; 4: 135–139.
8. Тринеева О. В., Сливкин А. И., Самылина И. А. Исследования по разработке проектов фармакопейных статей на плоды и масло облепихи крушиновидной. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2016; 3: 126–133.
9. Астафьева А. А., Куприянова Е. А., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Помогайбин А. В. Исследование люминесценции тканей побегов тополя красноплодного (*Populus rubrinervis* Hort.) как перспективного источника флавоноидов. В сборнике: Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы III-я Межвузовская научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Сборник материалов. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2018: 73–78.
10. Васюкова А. И., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Люминесцентный анализ листьев тысячелистника хрящеватого (*Achillea cartilaginea* Ledeb.). В сборнике: Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы Сборник материалов. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2017: 119–127.
11. Никитина А. С., Логвиненко Л. А., Никитина Н. В., Нигарян С. А. Морфометрическое и гистохимическое исследование травы мелиссы лекарственной из коллекции никитского ботанического сада. *Фармация и фармакология*. 2018; 6(6): 504–534.
12. Лапина А. С., Куркин В. А., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Новые аспекты в морфолого-анатомической диагностике травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.). *Аспирантский вестник Поволжья*. 2019; 1-2: 19–26.
13. Азизова Т. М., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В. Результаты люминесцентного анализа плодов фенхеля обыкновенного (*Foeniculum vulgare* Mill.). В сборнике: Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы. Сборник материалов. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2017: 104–113.
14. Левшанова Е. В., Хусайнова А. И., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Куркина А. В. Результаты люминесцентного анализа соцветий пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.). В сборнике: Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы III-я Межвузовская научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Сборник материалов. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2018: 79–87.
15. Егорова А. В., Рыжов В. М., Тарасенко Л. В., Зюлин Н. С. Результаты люминесцентного анализа утилизированной надземной части пихты сибирской (*Abies sibirica*). В сборнике: Современные проблемы фармакогнозии Сборник материалов III-й Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. 2018: 111–118.
16. Морозова Т. В. Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.). Автореферат диссертации кандидата фарм. наук. Самара. 2019: 23.

REFERENCES

1. Buktshynov A. D., Trofimov T. T., Ermakov B. S. et al. Sea buckthorn. M.: Publishing house «Forest industry». 1978: 192 (In Russ.).
2. Trineeva O. V. Comprehensive study of content and the digital profile of biologically active substances of buckthorn fruits. Voronezh: VSU Publishing House. 2016: 224. (In Russ.).
3. Russian Federation State Pharmacopoeia XIII ed. 2015; 2: 1004. Available at: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (in Russ.).
4. Russian Federation State Pharmacopoeia XIV ed. 2018; 4: 7019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russ.).
5. Rudaya M. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I., Danshina I. A. Study of diagnostic signs of sea buckthorn fruits of various varieties. *Pharmacy*. 2017; 66(7): 11–15. (In Russ.).
6. Rudaya M. A., Trineeva O. V., Gudkova A. A., Slivkin A. I., Boyto G. A., Danshina I. A. Fruits of buckthorn buckthorn: morphological and anatomical characters of various varieties. *Pharmacy*. 2018; 67(2): 21–26 (In Russ.).
7. Trineeva O. V., Shikunova N. S., Maltseva A. A., Slivkin A. I. Study of microscopic signs of dried fruits of sea buckthorn. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2014; 4: 135–139 (In Russ.).
8. Trineeva O. V., Slivkin A. I., Samylina I. A. Research on the development of draft pharmacopoeial articles on the fruits and buckthorn oil of buckthorn. *Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2016; 3: 126–133 (In Russ.).
9. Astafyeva A. A., Kupriyana E. A., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Pomogaybin A. V. Study of the luminescence of tissues of shoots of the Red-nosed poplar (*Populus rubrinervis* Hort.) As a promising source flavonoids. In the collection: Pharmaceutical Botany: Modernity and Prospects III Interuniversity Scientific and Practical Conference dedicated to the 100th anniversary of Samara State Medical University. Collection of materials. *Samara State Medical University*. 2018: 73–78 (In Russ.).
10. Vaskova A. I., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Luminescent analysis of cartilaginous yarrow leaves (*Achillea cartilaginea* Ledeb.). In the collection: Pharmaceutical botany: modernity and prospects. Collection of materials. *Samara State Medical University*. 2017: 119–127 (in Russ.).
11. Nikitina A. S., Logvinenko L. A., Nikitina N. V., Nigaryan S. A. Morphometric and histochemical study of the lemon balm herb from the collection of the Nikitsky Botanical Garden. *Pharmacy and pharmacology*. 2018; 6(6): 504–534 (In Russ.).
12. Lapina A. S., Kurkin V. A., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. New aspects in the morphological and anatomical diagnosis of duodenal monarda grass (*Monarda fistulosa* L.). *Graduate student of the Volga region*. 2019; 1-2: 19–26 (In Russ.).
13. Azizova T. M., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V. Results of luminescence analysis of common fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). In the collection: Pharmaceutical botany: modernity and prospects. Collection of materials. *Samara State Medical University*. 2017: 104–113 (In Russ.).
14. Levshanova E. V., Khusainova A. I., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Kurkina A. V. Results of luminescence analysis of common tansy inflorescences (*Tanacetum vulgare* L.). In the collection: Pharmaceutical Botany: Modernity and Prospects III Inter-University Scientific and Practical Conference dedicated to the 100th anniversary of Samara State Medical University. Collection of materials. *Samara State Medical University*. 2018: 79–87 (In Russ.).
15. Egorova A. V., Ryzhov V. M., Tarasenko L. V., Zulin N. S. Results of luminescence analysis of the utilized aerial part of Siberian fir (*Abies sibirica*). In the collection: Modern problems of pharmacognosy. The collection of materials of the III Interuniversity scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 100th anniversary of Samara State Medical University. *Samara State Medical University*. 2018: 111–118 (In Russ.).
16. Morozova T. V. Pharmacognostic study of certain species of the genus Hawthorn (*Crataegus* L.). Abstract of the dissertation of the candidate farm. sciences. Samara. 2019: 23 (In Russ.).

Физико-химические свойства и методы контроля пантопразола натрия сесквигидрата (обзор)

В. А. Шелехова^{1*}, К. Р. Савельева¹, С. В. Поляков¹, В. Н. Шестаков¹

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

*Корреспондентское лицо: Шелехова Вера Александровна. E-mail: Shelekhova.va@gilsinp.ru

Статья получена: 18.12.2019. Статья принята к печати: 23.01.2020

Резюме

Введение. Пантопразола натрия сесквигидрат является ингибитором протонной помпы. Данное вещество применяется в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки или желудка в фазе обострения, в том числе ассоциированной с приемом нестероидных противовоспалительных средств.

Текст. По своей структуре пантопразол представляет натриевую соль 5-(дифторметокси)-2-[(3,4-диметокси-2-пиридинил)метил]сульфинил)-1-Н-бензимидазола. Субстанция легко растворима в воде и этиловом спирте. Подлинность пантопразола подтверждают методом инфракрасной спектроскопии, а также положительной реакцией на ион натрия. Для количественного определения данного вещества используют химические и физико-химические методы. Так к первой группе относится титрование в неводной среде хлорной кислотой и перманганатометрия. Из физико-химических методов применяют спектрофотометрию и ВЭЖХ. Наиболее часто используется прямая спектрофотометрия, связанная с измерением оптической плотности при длине волны максимума поглощения пантопразола в различных растворителях. Кроме того, известны спектрофотометрические методики количественного определения, основанные на изучении поглощения окрашенных продуктов реакции пантопразола. Для анализа его препаратов используют производную спектрофотометрию. Контроль содержания примесей и пантопразола в субстанции и его лекарственных формах осуществляют, как правило, с помощью ВЭЖХ.

Заключение. Анализ литературы показывает, что данное вещество является нестабильным. Поэтому эту его особенность необходимо учитывать при выборе вспомогательных веществ при разработке лекарственной формы. Предпочтительным методом анализа препаратов пантопразола является ВЭЖХ, так как можно определять вещество в присутствии других соединений, что позволит контролировать количественное содержание и стабильность пантопразола в препарате.

Ключевые слова: пантопразола натрия сесквигидрат, физико-химические свойства, методы анализа.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

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

Для цитирования: Шелехова В. А., Савельева К. Р., Поляков С. В., Шестаков В. Н. Физико-химические свойства и методы контроля пантопразола натрия сесквигидрата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 46–53.

Physical and Chemical Properties and Methods of Control of Pantoprazol Sodium Sesquihydrate (Review)

Vera A. Shelekhova^{1*}, Kristina R. Savelyeva¹, Sergei V. Polyakov¹, Vladislav N. Shestakov¹

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

*Corresponding author: Vera A. Shelekhova. E-mail: Shelekhova.va@gilsinp.ru

Received: 18.12.2019. Accepted: 23.01.2020

Abstract

Introduction. Pantoprazole sodium sesquihydrate is a proton pump inhibitor. This substance is used in the treatment of peptic ulcer of the duodenum or stomach in the acute phase, including those associated with the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Text. Pantoprazole is sodium 5-(difluoromethoxy)-2-[(RS)-[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfinyl]benzimidazol-1-ide sesquihydrate in its structure. The substance is readily soluble in water and ethyl alcohol. The identification of pantoprazole is confirmed by infrared absorption spectrophotometry, as well as by a positive reaction to sodium ion. For the assay of this substance chemical and physico-chemical methods are used. The first group of methods includes titration in a non-aqueous medium with perchloric acid and permanganatometry. Physico-chemical methods used for pantoprazole assay are spectrophotometry and HPLC. The most commonly used method is direct spectrophotometry associated with the measurement of optical density at a wavelength of the maximum absorption of pantoprazole in various solvents. In addition, spectrophotometric methods of assay are known, based on the study of the absorption of colored pantoprazole reaction products. The derivative spectrophotometry is used for the analysis of its preparations. The control of the content of impurities and pantoprazole in the substance and its dosage forms is carried out, as a rule, using HPLC.

Conclusion. An analysis of the literature has shown that this substance is unstable. Therefore, this feature of pantoprazole must be considered when choosing excipients when developing a dosage form. The preferred method for analyzing pantoprazole preparations is HPLC, since it is possible to determine the substance in the presence of other compounds, which will allow one to control the quantitative content and stability of pantoprazole in the preparation.

Keywords: pantoprazole sodium sesquihydrate, physical and chemical properties, methods of analysis.

Conflict of interest: no conflict of interest.

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

For citation: Shelekhova V. A., Savelyeva K. R., Polyakov S. V., Shestakov V. N. Physical and chemical properties and methods of control of pantoprazol sodium sesquihydrate. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 46–53.

ВВЕДЕНИЕ

Пантопразола натрия сесквигидрат (Ппз) является ингибитором протонной помпы (ИПП). Он ингибирует H^+-K^+ -АТФазу париетальных клеток желудка, тем самым нарушает перенос ионов водорода из париетальной клетки в просвет желудка и блокирует конечный этап гидрофильной секреции соляной кислоты [1]. Данное вещество превосходит аналогичные ИПП (омепразол и лансопризол) по избирательности и фармакокинетическим свойствам. Его биодоступность значительно выше, чем у омепразола, и не зависит от еды. Кроме того, Ппз не влияет на активность цитохрома Р 450 печени [2].

Ппз применяется в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки или желудка в фазе обострения, в том числе ассоциированной с приемом нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), или рефрактерной к терапии блокаторами гистаминовых H_2 -рецепторов; гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (умеренные и тяжелые формы); синдрома Золлингера – Эллисона; комбинированной антихеликобактерной эрадикационной терапии у пациентов с пептической язвой с целью уменьшения частоты рецидивов [1].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

По своей структуре Ппз представляет натриевую соль 5-(дифторметокси)-2-(3,4-диметокси-2-пиридинил)метилсульфинил)-1-Н-бензимидазола (рисунок 1). По внешнему виду данное вещество – белый или почти белый порошок [3]. Температура плавления составляет 139–140 °С. Ппз оптически активен, оптическое вращения $-0,4$ до $+0,4^\circ$. Его растворимость представлена в таблице 1 [4].

Таблица 1. Растворимость Ппз в различных растворителях

Table 1. The solubility of Ppz in various solvents

Растворитель	Количество, растворенное при 25 °С (мг/мл)
Вода	≥ 1000
Метиловый спирт	≥ 2000
Этиловый спирт	≥ 1000
Ацетон	270
Хлороформ	0,022
Дихлорметан	0,018
Диэтиловый эфир	0,001
н-Гексан	0,001

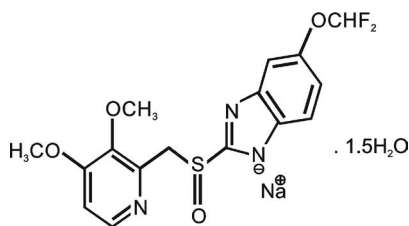


Рисунок 1. Структура Ппз

Figure 1. The structure of the Ppz

МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Подлинность Ппз подтверждают методом инфракрасной спектроскопии. В области от 4400 до 400 cm^{-1} в дисках с калия бромидом обнаружены следующие полосы поглощения, ν_{max} , cm^{-1} : 3010 (C–H ароматического группы), 2941 и 2835 (C–H алифатической группы), 1588 (C=N), 1492, 1466, 1452 и 1428 (C=C ароматического кольца), 1362 и 1384 (C–H в CH_3 -, CH_2 -), 1304 (CF_2), 1070 (S=O), 805, 1027 и 1040 (C–O в $-OCH_3$) [3]. Для Ппз характерна положительная реакция на наличие натрия с раствором калия пироантимоната [3].

Согласно европейской фармакопеи [3] определяют 6 контролируемых примесей Ппз (рисунок 2). Они анализируются методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке С 18. В качестве подвижной фазы используют смесь: раствор калия гидрофосфата (1,74 г/л, рН 7,00 с помощью раствора фосфорной кислоты 330 г/л) и ацетонитрил с градиентным элюированием. Длина волны детектирования примесей составляет 290 нм, для примеси С – 305 нм; температура термостата колонки – 40 °С; скорость потока – 1,0 мл/мин.

Для количественного определения Ппз согласно требованиям фармакопеи [3] используют ацидиметрию в неводной среде. В качестве титранта применяют хлорную кислоту, конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Ппз можно также анализировать с помощью метода УФ-спектрофотометрии на основе его прямого поглощения ультрафиолетового излучения при длине волны 295 нм после растворения в 0,1 М растворе натрия гидроксида. В таблице 2 представлены длины волн максимумов поглощения Ппз, растворенного в различных растворителях, и его удельные показатели поглощения [4]. В других источниках литературы [5, 6] при количественном определении Ппз в таблетках используют максимум поглощения водного раствора Ппз при 289 и 292 нм.

Таблица 2. Длины волны максимумов УФ-поглощения и удельные показатели поглощения Ппз в различных растворителях

Table 2. Wavelengths of UV absorption maxima and absorptivity parameter of Ppz in various solvents

Растворитель	Длина волны, нм	Удельный показатель поглощения $A^{1\%}_{1\text{ см}}$
Вода очищенная	287	326
0,1 М раствор натрия гидроксида	294	420
рН 9	294	417
рН 7	287	328
рН 6	288	315
Метиловый спирт	289	387
Этиловый спирт	290	390
Хлороформ	289	398

Помимо УФ-спектрофотометрии для анализа препаратов Ппз используют производную спектрофотометрию. Так в [7] сравнивают две методики: опре-

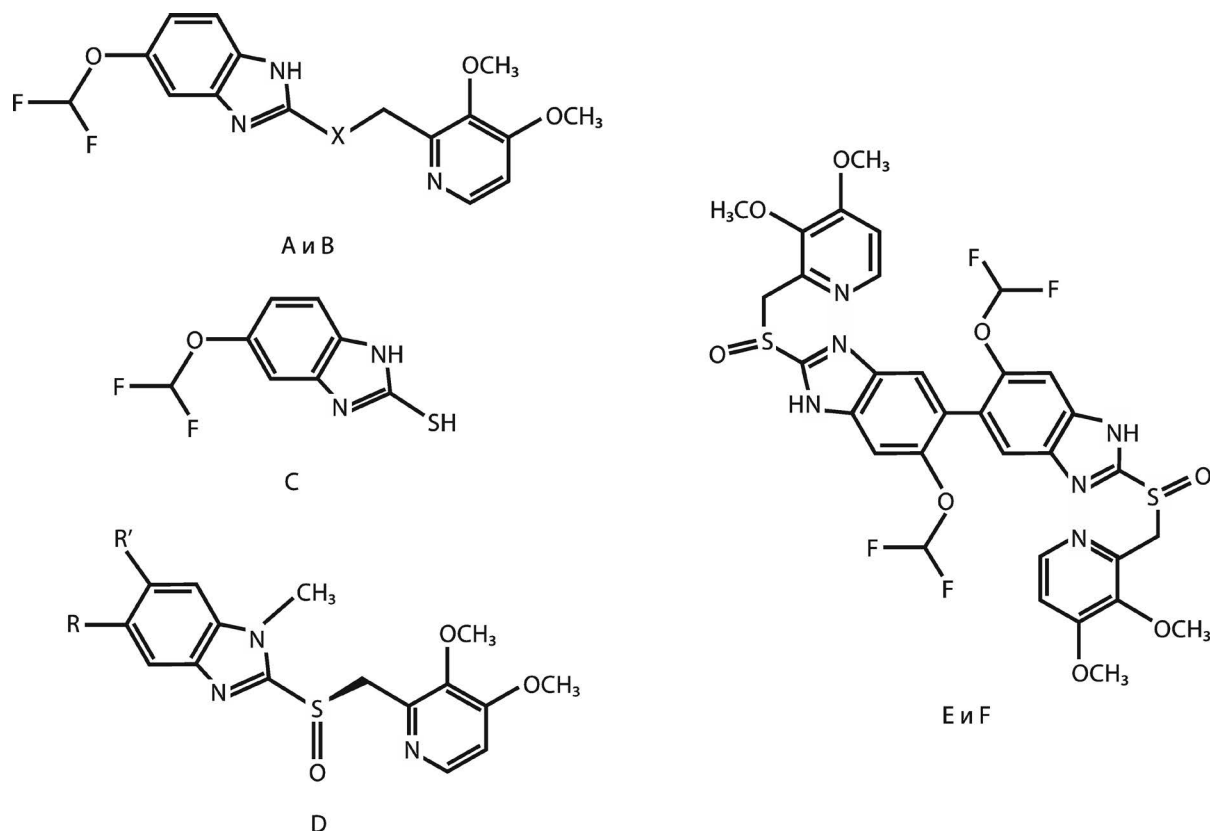


Рисунок 2. Контролируемые примеси Ппз: А – $X=SO_2$: 5-(дифторметокси)-2-[[[(3,4-диметоксипиридин-2-ил)метил]сульфо-
нил]-1Н-бензимидазол; В – $X=S$: 5-(дифторметокси)-2-[[[(3,4-диметоксипиридин-2-ил)метил]сульфанил]-1Н-бензимидазол; С –
5-(дифторметокси)-1Н-бензимидазол-2-тиол; D – $R=OCHF_2$, $R'=H$: 5-(дифторметокси)-2-[(RS)-[(3,4-диметоксипиридин-2-ил)
метил]сульфинил]-1-метил-1Н-бензимидазол; E – смесь стереоизомеров 6,6'-бис(дифторметокси)-2,2'-бис [[[(3,4-диметоксипири-
дин-2-ил)метил]сульфинил]-1Н, 1'Н-5,5'-бибензимидазолил; F – $R=H$, $R'=OCHF_2$: 6-(дифторметокси)-2-[(RS)-[(3,4-диметоксипири-
дин-2-ил)метил]сульфинил]-1-метил-1Н-бензимидазол

Figure 2. Controlled impurities: A – $X=SO_2$: 5-(difluoromethoxy)-2-[[[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfonyl]-1H-benzimidazole,
B – $X=S$: 5-(difluoromethoxy)-2-[[[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole; C – 5-(difluoromethoxy)-1H-benzi-
midazole-2-thiol; D – $R=OCHF_2$, $R'=H$: 5-(difluoromethoxy)-2-[(RS)-[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfinyl]-1-methyl-1H-benzimi-
dazole; E – mixture of the stereoisomers of 6,6'-bis(difluoromethoxy)-2,2'-bis[[[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfinyl]-1H,
1'H-5,5'-bibenzimidazolyl; F – $R=H$, $R'=OCHF_2$: 6-(difluoromethoxy)-2-[(RS)-[(3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl]sulfinyl]-1-methyl-
1H-benzimidazole

деляют содержание Ппз по оптической плотности в максимуме поглощения при длине волны 295 нм и по первой производной поглощения при длине волны 303 нм. Для получения исследуемых растворов используется смесь метилового спирта и воды в соотношении 1:9 (об./об.). При сравнении двух методик не обнаруживается существенного различия между предлагаемыми методиками. Также отмечают, что методика по первой производной поглощения была относительно более чувствительной. В статье [8] рассматривают методики анализа Ппз в водно-метанольном растворе на основе определения оптической плотности в максимуме поглощения при 290 нм (метод А), первой производной поглощения при длине волны 282 нм (метод В) и площади под спектральной кривой в диапазоне длин волн 286–296 нм (метод С). Разработанные методики статистически сопоставимы, при этом отсутствует существенная разница между тремя методами.

В [9] предложена спектрофотометрическая методика определения Ппз в фармацевтических препаратах, основанная на реакции лекарственного средства с 1-фтор-2,4-динитробензолом в ДМСО при комнатной температуре (рисунок 3). Поглощение окрашенного продукта измеряют при 420 нм.

В статье [10] описана спектрометрическая методика определения Ппз, основанная на образовании продукта коричневого цвета при взаимодействии лекарственного вещества с калия перманганатом в нейтральной среде, при этом оптическую плотность измеряют при 350 нм.

В другой статье [11] представлен титриметрический и спектрофотометрический анализ с использованием калия перманганата. В обоих методах Ппз обрабатывают избытком калия перманганата в среде серной кислоты. В случае спектрофотометрии измеряют поглощение непрореагировавшего окислителя при длине волны 545 нм. При титриметрии определяют ко-

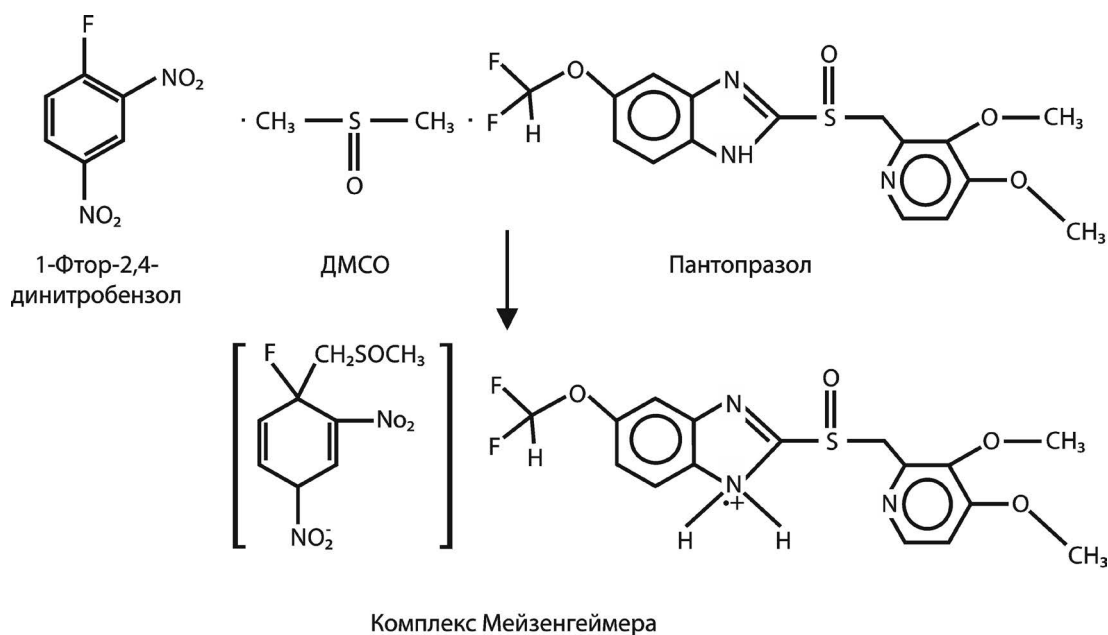


Рисунок 3. Схема реакции Ппз с 1-фтор-2,4-динитробензолом в ДМСО

Figure 3. Scheme of the reaction of Ppz with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene in DMSO

личество непрореагировавшего калия перманганата путем обратного титрования стандартным раствором железа(II) аммония сульфата. Предполагается, что стехиометрия реакции лекарственного вещества с окислителем составляет 1:1.

Существует спектрофотометрическая методика определения Ппз, основанная на реакции с N-бромсукцинимидом в среде хлористоводородной кислоты. Непрореагировавший N-бромсукцинимид оценивается по двум реакционным схемам, включающим использование железа(II) и тиоцианата (метод А) или 4,5-дигидроксibenзол-1,3-дисульфата натрия (метод Б). В методе А определяют оптическую плотность при длине волны 470 нм, в методе Б – при 670 нм. В двух методах строят калибровочный график зависимости уменьшающихся значений поглощения от концентрации Ппз [12].

Разработаны две спектрофотометрические методики для определения Ппз. Методики основаны на восстановлении железа хлорида Ппз в нейтральной среде и на последующем комплексообразовании железа(II) с 1,10-фенантролином (метод А) или 2,2'-бипиридилом (метод Б). В результате образуются комплексы красного цвета (рисунок 4), которые анализируют при длине волны 510 и 520 нм для метода А и метода Б, соответственно [13].

На основе реакции окисления Ппз солью железа(III) – железа(III) аммония сульфатом – в сернокислой среде разработана спектрофотометрическая методика. В результате железо(III) восстанавливается до железа(II), который в сочетании с калия гексацианоферратом(III) образует окрашивание «прусский синий». При этом измеряют поглощение окрашенного продукта при длине волны 725 нм [14].

В статье [15] предложена методика ВЭЖХ для одновременного анализа Ппз и итоприда гидрохлорида в их комбинированном препарате (таблетки). Используют колонку Phenomenex® C 18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм), подвижную фазу, состоящую из фосфатного буфера и ацетонитрила в соотношении 55:45 (об./об.) с pH 5,0 и УФ-детектирование при 289,0 нм. Колонку, поддерживаемую при комнатной температуре, элюируют подвижной фазой со скоростью потока 1,0 мл/мин. Ппз, итоприда гидрохлорид и их комбинированный лекарственный препарат подвергаются воздействию термических, фотолитических, гидролитических и окислительных стрессовых условий, а данные образцы анализируют предложенной методикой. Ппз разрушается с образованием более, чем четырех продуктов в большинстве условий стресса, за исключением исследований на УФ-облучение и влажности (75 %). Специфичность методики анализа доказана тем, что пики продуктов разложения Ппз, итоприда гидрохлорида и основные пики лекарственных веществ не накладываются друг на друга.

Для установления стабильности Ппз 4 мг/мл в 0,9%-ом растворе хлорида натрия, хранящемся при комнатной температуре и при охлаждении в полипропиленовых шприцах в течение 96 часов, используют метод ВЭЖХ. Система включает колонку C 18, выдерживаемую при комнатной температуре. Подвижная фаза состоит из ацетонитрила и 0,05 М раствора калия гидрофосфата, доведенного до pH 7,0 разбавленной фосфорной кислотой (40:60 по объему). Скорость потока составляет 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляют при 280 нм [16].

В статье [17] определяют физическую совместимость и химическую стабильность Ппз с этилендиаминтетрауксусной кислотой в стеклянных флаконах,

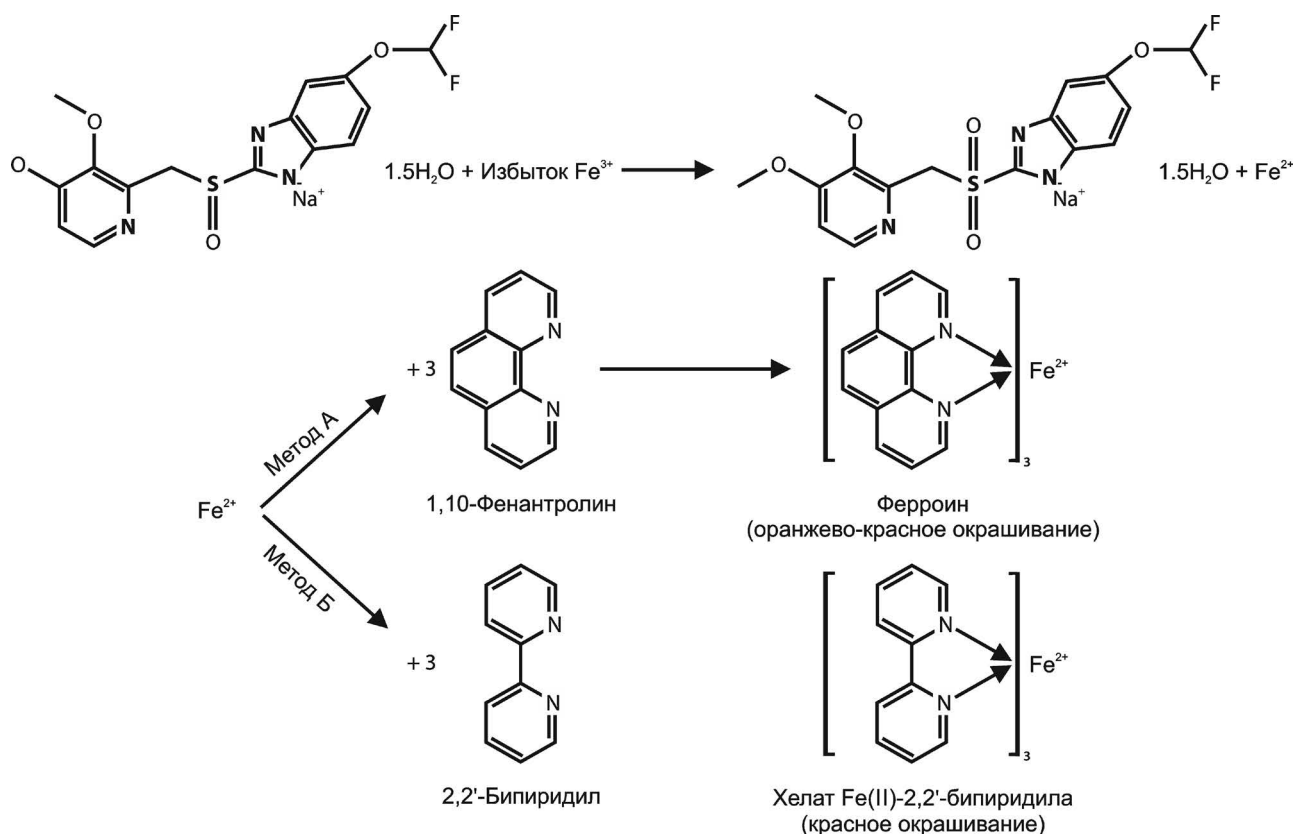


Рисунок 4. Предполагаемая схема реакций

Figure 4. Estimated reaction scheme

полипропиленовых шприцах и пакетах из поливинилхлорида при хранении температура от 2 до 8 °C без действия света или при 20 °C до 25 °C при воздействии света методом ВЭЖХ. Подвижная фаза для системы ВЭЖХ содержит 35 % ацетонитрила с 65%-ым фосфатным буфером (pH 7,1). Неподвижная фаза для системы ВЭЖХ представляет собой колонку C 18 4,6 × 250 мм; 5 мкм. Скорость потока составляет 1 мл/мин. Длина волны детектирования – 290 нм.

Разработана методика определения Ппз и левосульпирида в комбинированной дозированной форме (капсулы) методом обращено-фазной ВЭЖХ. Разделение достигнуто на колонке Thermo BDS Hypersil C 18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) при температуре окружающей среды. Определение Ппз и левосульпирида проводят при длине волны 238 нм (λ_{max} для левосульпирида), что дает наивысшую чувствительность методики. Используют изократическое элюирование с помощью 0,02 М раствора калия дигидрофосфата (pH 4) и ацетонитрила (60:40 об./об.) при скорости потока 1,0 мл/мин. Исследования деградации проводят путем воздействия на лекарственные вещества различных стрессовых условий, таких как кислота, щелочь, перекись водорода. Фотостабильность определяют путем хранения образцов в течение 24 ч под ультрафиолетовым излучением в камере. При изучении тепловой стабильности удерживают образцы в горячем воздухе при температуре 80 °C в течение 24 часов. При воздействии стрессовых

условий оба лекарственных вещества восприимчивы к окислительным, термическим и фотолитическим условиям. Так в кислотных и щелочных условиях Ппз подвергается разрушению с образованием веществ, пики которых хорошо разделены на хроматограмме, в то время как левосульпирид тоже подвергается деструкции, но пики продуктов деградации не разделены [18].

В исследовании [19] представлена методика ВЭЖХ для определения Ппз в присутствии его продуктов разложения. Лекарственное вещество относительно стабильно в обычных условиях, но не стабильно в кислой среде, в присутствии окислителей, при высокой температуре и на свету. Разделение лекарственного вещества и его продуктов разложения достигается на колонке Nova-Pak C 18 (150 × 3,9 мм, 4 мкм) с использованием смеси ацетонитрила и 0,01 М раствора калия дигидрофосфата (pH 7,4) (25:75) в качестве подвижной фазы. УФ-детектирование проводят при 290 нм. Выявлено, что Ппз полностью разрушается под действием 1 М или 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной примерно в течение 10 мин. При использовании 0,05 М раствора кислоты хлористоводородной наблюдается деградация около 86 % через 30 мин при комнатной температуре, и некоторые продукты разложения обнаруживаются при времени удерживания 1,5; 3,3 и 8 мин. Последующие исследования проводят в более мягких условиях с использованием 0,01 М раствора кислоты хлористоводородной при комнатной темпе-

ратуре, Ппз разрушается в этом состоянии примерно на 35 и 92 % через 10, 60 мин, соответственно, с образованием тех же продуктов, которые наблюдаются при использовании 0,05 М раствора кислоты хлористоводородной. При всех кислотных разрушениях раствор приобретает желтый цвет. Ппз стабилен в присутствии 0,1 М раствора натрия гидроксида в течение 5 дней при комнатной температуре. После 5 дней воздействия 1 М раствора натрия гидроксида при комнатной температуре наблюдают умеренную деградацию (<5 %). С другой стороны, около 18 %, 39 % и 69 % разложения Ппз наблюдается в присутствии 1 М раствора натрия гидроксида после 1, 2, 4 часов кипячения с обратным холодильником. Два других новых пика наблюдаются также на хроматограмме при времени удерживания 1,7 и 2,2 мин. Незначительная деградация (<5 %) наблюдается в нейтральном состоянии при комнатной температуре через 5 дней. С другой стороны, после кипячения с обратным холодильником Ппз в дистиллированной воде через 1, 2 или 4 часов наблюдается уменьшение содержания на 26 %, 47 %, 78 % с появлением двух основных пиков при времени удерживания 1,2 и 3,9 мин. Раствор становится желто-коричневого цвета примерно через 1 час, который со временем становится более глубоким по цвету. Ппз разрушается примерно на 53 % через 2 часа и на 67 % после 3-часового воздействия 3 % раствора перекиси водорода при комнатной температуре. На хроматограмме обнаружены два основных пика со временем удерживания 1,4 и 2,1 мин. Площадь первого пика со временем существенно не изменяется, но площадь последнего пика увеличивается во времени. Порошок Ппз разрушается примерно на 10 % при воздействии сухого тепла при 70 °C через 24 часа и примерно на 54 % при 95 °C через 24 часа. Его стабильность в порошке исследована в видимом свете. Незначительное разложение (<1 %) наблюдается при воздействии видимого света через 5 дней. По-видимому, Ппз в твердой форме относительно стабилен при воздействии света. Деструкция около 10 % определяется через 3 дня при воздействии ультрафиолетового света. При использовании раствора Ппз происходит более значительная деградация. При выдерживании его раствора под влиянием ультрафиолетового излучения наблюдается 36 % разложения через 24 часа с образованием нового пика со временем удерживания 3,9. Количество разложения составляет около 64 % через 60 часов, а площадь пика продукта разложения увеличена. Следует отметить, что температура камеры УФ-света повышается до 50 °C. Раствор Ппз также является относительно стабильным в видимом свете. При воздействии видимого света через 5 дней наблюдается примерно 6 % разложения.

В статье [20] предложена методика одновременного определения Ппз, домперидона и дротаверина в порошке и в таблетках с использованием метода ВЭЖХ. Эти вещества разделяют на колонке Millenium C 18 SD (100 × 4,6 мм, 5 мкм) с подвижной фазой, со-

державшей метиловый спирт, ацетонитрил и 0,02 М раствор калия гидрофосфата (pH 7,0) в соотношении 20:33:47 (об./об./об.) при скорости потока 1 мл/мин для Ппз, 2,5 мл/мин для домперидона и 1 мл/мин для дротаверина. Обнаружение Ппз и дротаверина осуществляют при длине волны 290 нм и для домперидона при 240 нм. Скорость потока запрограммирована как 1–7,5 мин: 1 мл/мин (λ 290 нм); 7,70–13,70 мин: 2,5 мл/мин (λ 240 нм); 14,00–15,00 мин: 1 мл/мин (λ 290 нм). Данную методику используют для изучения стабильности лекарственных веществ. Выявлено, что Ппз в кислой среде разлагается на 87 %, в щелочной среде – 8 %, в нейтральной среде – 55 %. Следовательно, стабильность Ппз зависит от pH; с увеличением pH скорость деградации уменьшается.

В условиях окислительного стресса 90–95 % разложения наблюдается для всех трех лекарственных веществ (время удерживания продуктов деградации – 1,9; 8,02 и 13,22 мин). Чтобы выяснить происхождение этих пиков, анализируют отдельно все вещества в аналогичных условиях. Разложение дротаверина приводит к двум пикам при 8,02 и 13,22 мин. Пик при 1,9 мин считается продуктом деградации Ппз. В этом случае, рост площади пика продукта разложения соответствует падению пика Ппз, что указывает на то, что Ппз разрушается до хромофорного разложения. Продукты деструкции окислением, предположительно, являются сульфон или N-окисдные аналоги Ппз (рисунок 5). Фотолитическая деградация вызывает разложение Ппз до 77 %, при этом на хроматограмме наблюдают один крупный пик возможного продукта разложения со временем удерживания 2,0 мин и группу пиков продуктов деградации с временами удерживания 1,0–2,5 мин. Воздействие тепла приводит к незначительному разложению без образования какого-либо пика. Обнаружено, что Ппз очень восприимчив к низкому pH и подвергается деградации на 95 % в желудочном соке, образуя четыре вещества деградации. Возможные продукты разложения Ппз – аналоги сульфоновой кислоты или сульфонамида (рисунок 5).

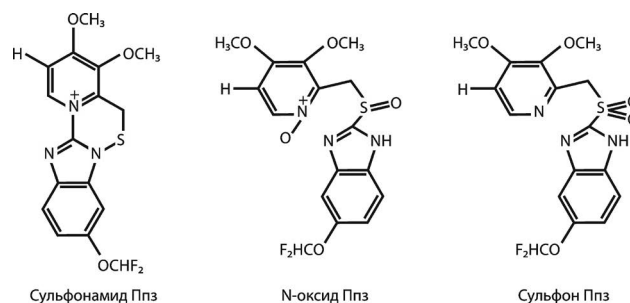


Рисунок 5. Возможные продукты разложения Ппз

Figure 5. Possible decomposition products

Методика ВЭЖХ разработана для анализа Ппз в присутствии примесей. Разделение лекарственного вещества, его потенциальных примесей и продук-

тов разложения достигнуто на колонке Hypersil ODS с использованием градиента, включая 0,01 М фосфатным буфером (рН 7 с ортофосфорной кислотой) и ацетонитрилом в качестве элюента при длине волны обнаружения 290 нм. Скорость потока устанавливают равной 1 мл/мин. Температуру колонки поддерживают на уровне 40 °С. Длина волны максимума поглощения большинства примесей находится вблизи 290 нм. Обнаружено, что Ппз разрушается в кислых и окислительных условиях, в то время как остается стабильный в щелочных, термических и фотолитических условиях. Основными примесями в кислой и окислительной среде являются сульфид и сульфен [21].

Проведены исследования разложения стандарта Ппз и таблеток Пантосек (Pantosec, Cipla LTD) методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией. Метод ВЭЖХ позволяет разделять все продукты деградации, образующиеся при различных условиях стресса. В анализе используют колонку Hypersil Gold C 18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм), подвижная фаза состоит из ацетонитрила и 0,01 М буфера аммония ацетата. Скорость потока и длина волны обнаружения составляют 1 мл/мин и 286 нм, соответственно. Продукты разложения, образованные из препарата, идентифицированы путем сравнения соответствующих хроматограмм образцов, полученных после исследований принудительной деградации, с хроматограммой стандарта.

Ппз разлагается в кислой среде, образуя вещество [ДП-2 ($m/z = 336,11$)] со временем удерживания пика 15,09 мин из-за потери ($-S=O$) и ДП-1 (время удерживания – 12,69 мин, $m/z = 384,07$) из-за потери кислорода, а ДП-3 ($m/z = 733$) сформирован после димеризации (время удерживания – 23,74 мин). Стабильность Ппз зависит от рН; скорость деградации снижается с увеличением рН. В условиях окислительного стресса повышение площади пиков продуктов разложения соответствует уменьшению исходного пика Ппз, что указывает на то, что лекарственное вещество подвергается хромофорному разложению. Эти продукты окислительной деградации, возможно, представляют собой ДП-4, то есть, сульфен (время удерживания – 19,19; $m/z = 400$) и ДП-5 – N-оксид (время удерживания – 14,90; $m/z = 416$) аналогов Ппз, образованных реакцией окисления сульфенильной части или пиридинового азота. Когда твердое лекарственное вещество подвергается фотолизу, образуются продукты разложения с m/z 368 и 336. В жидком состоянии идентифицировано образование продуктов деградации с m/z 400 и 336 [2].

В [22] исследовании предложена методика определения Ппз и домперидона в капсулах методом ВЭЖХ. Для разделения веществ используют аналитическую колонку Phenomenex Gemini C 18 (150 × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза состоит из метилового спирта, ацетонитрила, 0,02 М раствора калия гидрофосфата с рН 7,0 (20:33,11:46,89 об./об./об.) при скорости потока 1,10 мл/мин. При подборе хроматографических условий значение рН водной фазы не изменяется и под-

держивается на уровне 7,0, так как это может повлиять на стабильность ингибитора протонной помпы. Длина волны детектирования выбрана 280 нм. Исследования принудительной деградации выполняют не только на лекарственном препарате, но и на субстанциях, для определения того, что наблюдаемое разложение происходит из-за свойств вещества или вызвано взаимодействием веществ между собой. Ппз подвергается разложению на 33 и 32 % под действием кислоты в субстанции и в капсулах. С другой стороны, это вещество достаточно стабильно при щелочных и нейтральных условиях. В условиях окислительного стресса почти 51 % Ппз подвергается хромофорному разложению, так как наблюдается повышение площади пиков продуктов разложения в соответствии с уменьшением исходного пика. В этих условиях, возможно, в результате реакции окисления сульфенильной части или пиридинового азота образуются сульфен или N-оксидные аналоги Ппз, не обладающие никаким терапевтическим эффектом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы показывает, что Ппз является нестабильным веществом. Поэтому данную его особенность необходимо учитывать при выборе вспомогательных веществ при разработке лекарственной формы. Так как вещества в смеси могут влиять на стабильность друг друга. Например, Ппз способен разрушаться, причем скорость деградации зависит от рН среды. Она будет выше, чем меньше значения рН среды. В различных публикациях представлено, что возможными продуктами разложения Ппз в кислой среде являются аналоги сульфеновой кислоты или сульфенамида, а также вещества, образующиеся в результате потери группы ($-S=O$), кислорода и реакции димеризации. Согласно литературным данным предпочтительным методом анализа является ВЭЖХ, так как можно определять вещество в присутствии других соединений, что позволит контролировать количественное содержание и стабильность Ппз в препарате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пантопразол. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2670.htm (дата обращения 03.12.2019).
2. Priya D. S., Prashanthi K., Parijatha B., Mohan C. K. Validation of stability indicating LC-MS assay method for determination of pantoprazole sodium sesquihydrate. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2017; 6(1): 1413–1426.
3. Издание Европейской Фармакопеи на русском языке. VII изд. В 2 т. М.: ООО «Ремедиум». 2011: 4504.
4. Badwan A. A., Nabulsi L. N., Omari M. M. A. et al. Pantoprazole Sodium. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. 2002; 29: 213–259. DOI: 10.1016/S1075-6280(02)29008-4.
5. Kumar R., Singh H., Singh P. Development of UV Spectrophotometric method for estimation of Pantoprazole in pharmaceutical dosage forms. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011; 3(2): 113–117.
6. Shinde V., Sarode V., Kshirsagar S., Jadhav A. Development and validation of UV Spectrophotometric method for estimation of pantoprazole sodium in bulk and tablet dosage form. *CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 5(4): 22–26.

7. Süslü İ., Altinöz S., Yildiz E. Determination of Pantoprazole in Tablet Dosage Forms by Two Different Spectrophotometric Methods. *FABAD J. Pharm. Sci.* 2003; 28: 85–92.
8. Patil S. S., Dhabale P. N., Kuchekar B. S. Spectrophotometric estimation of pantoprazole in tablet dosage form. *Int. J. Chem. Sci.* 2008; 6(4): 1984–1990.
9. Rahman N., Kashif M. Initial-rate method for the determination of pantoprazole in pharmaceutical formulations using 1-fluoro 2,4-dinitrobenzene. *Pharmazie*. 2005; 60(3): 197–200.
10. Devi O. Z., Basavaiah K., Vinay K. B. Sensitive and selective spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using permanganate. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2010; 16(1): 97–102. DOI: 10.2298/ciceq091006015d.
11. Basavaiah K., Rajendraprasad N., Tharpa K. et al. Titrimetric and Spectrophotometric Assay of Pantoprazole in Pharmaceuticals Using Permanganate. *J. Mex. Chem. Soc.* 2009; 53(1): 34–40. DOI: 10.29356/jmcs.v53i1.1015.
12. Rangachar U., Kumar A., Basavaiah K. Sensitive and validated spectrophotometric methods for the determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using n-bromosuccinimide based on redox and complexation reactions. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2008; 22(1): 135–141. DOI: 10.4314/bcse.v22i1.61350.
13. Devi O. Z., Basavaiah K. Validated spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using ferric chloride and two chelating agents. *International Journal of ChemTech Research*. 2010; 2(1): 624–632.
14. Rahman N., Bano Z., Azmi S. N. H. Kinetic Spectrophotometric Analysis of Pantoprazole in Commercial Dosage Forms. *Analytical sciences*. 2006; 22: 983–988. DOI: 10.2116/analsci.22.983.
15. Gupta K. R., Chawla R. B., Wadodkar S. G. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of pantoprazole sodium and itopride hydrochloride in bulk and capsule. *Orbital Elec. J. Chem.* 2010; 2(3): 209–224.
16. Johnson C. E. Stability of Pantoprazole in 0.9 % Sodium Chloride Injection in Polypropylene Syringes. *Am J Health Syst Pharm.* 2005; 62(22): 2410–2412. DOI: 10.2146/ajhp050132.
17. Donnelly R. F. Stability of Pantoprazole Sodium in Glass Vials, Polyvinyl Chloride Minibags, and Polypropylene Syringes. *CJHP*. 2011; 64(3): 192–198. DOI: 10.4212/cjhp.v64i3.1022.
18. Kothapalli L. P., Inamdar A. A., Nanda R. K., Thomas A. B. Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of Pantoprazole sodium sesquihydrate and Levosulpiride in a combined dosage form. *Int J Res Pharm Sci.* 2014; 4(4): 32–38.
19. Sour E., Ravari N. S., Alvandifar F. et al. Validated Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Pantoprazole in the Presence of Its Degradation Products. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010; 3(4): 879–884.
20. Mishra P. K., Upadhyay S., Tripathi A. C., Saraf S. K. Stability Indicating HPLC-UV Method for Simultaneous Estimation of Pantoprazole, Domperidone and Drotaverine. *Int. J. PharmTech Res.* 2015; 8(5): 912–923.
21. Pandey S., Pandey P., Mishra D., Singh U. K. A validated stability indicating HPLC method for the determination of process-related impurities in pantoprazole bulk drug and formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 49(1): 175–184. DOI: 10.1590/s1984-82502013000100019.
22. Sree J. V., Rajappan M., Kannappan V. Stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pantoprazole, rabeprazole, lansoprazole and domperidone from their combination dosage forms. *International Journal of Drug Development & Research*. 2011; 3(4): 323–335.
4. Badwan A. A., Nabulsi L. N., Omari M. M. A. et al. Pantoprazole Sodium. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. 2002; 29: 213–259. DOI: 10.1016/s1075-6280(02)29008-4.
5. Kumar R., Singh H., Singh P. Development of UV Spectrophotometric method for estimation of Pantoprazole in pharmaceutical dosage forms. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011; 3(2): 113–117.
6. Shinde V., Sarode V., Kshirsagar S., Jadhav A. Development and validation of UV Spectrophotometric method for estimation of pantoprazole sodium in bulk and tablet dosage form. *CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 5(4): 22–26.
7. Süslü İ., Altinöz S., Yildiz E. Determination of Pantoprazole in Tablet Dosage Forms by Two Different Spectrophotometric Methods. *FABAD J. Pharm. Sci.* 2003; 28: 85–92.
8. Patil S. S., Dhabale P. N., Kuchekar B. S. Spectrophotometric estimation of pantoprazole in tablet dosage form. *Int. J. Chem. Sci.* 2008; 6(4): 1984–1990.
9. Rahman N., Kashif M. Initial-rate method for the determination of pantoprazole in pharmaceutical formulations using 1-fluoro 2,4-dinitrobenzene. *Pharmazie*. 2005; 60(3): 197–200.
10. Devi O. Z., Basavaiah K., Vinay K. B. Sensitive and selective spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using permanganate. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2010; 16(1): 97–102. DOI: 10.2298/ciceq091006015d.
11. Basavaiah K., Rajendraprasad N., Tharpa K. et al. Titrimetric and Spectrophotometric Assay of Pantoprazole in Pharmaceuticals Using Permanganate. *J. Mex. Chem. Soc.* 2009; 53(1): 34–40. DOI: 10.29356/jmcs.v53i1.1015.
12. Rangachar U., Kumar A., Basavaiah K. Sensitive and validated spectrophotometric methods for the determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using n-bromosuccinimide based on redox and complexation reactions. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2008; 22(1): 135–141. DOI: 10.4314/bcse.v22i1.61350.
13. Devi O. Z., Basavaiah K. Validated spectrophotometric determination of pantoprazole sodium in pharmaceuticals using ferric chloride and two chelating agents. *International Journal of ChemTech Research*. 2010; 2(1): 624–632.
14. Rahman N., Bano Z., Azmi S. N. H. Kinetic Spectrophotometric Analysis of Pantoprazole in Commercial Dosage Forms. *Analytical sciences*. 2006; 22: 983–988. DOI: 10.2116/analsci.22.983.
15. Gupta K. R., Chawla R. B., Wadodkar S. G. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of pantoprazole sodium and itopride hydrochloride in bulk and capsule. *Orbital Elec. J. Chem.* 2010; 2(3): 209–224.
16. Johnson C. E. Stability of Pantoprazole in 0.9 % Sodium Chloride Injection in Polypropylene Syringes. *Am J Health Syst Pharm.* 2005; 62(22): 2410–2412. DOI: 10.2146/ajhp050132.
17. Donnelly R. F. Stability of Pantoprazole Sodium in Glass Vials, Polyvinyl Chloride Minibags, and Polypropylene Syringes. *CJHP*. 2011; 64(3): 192–198. DOI: 10.4212/cjhp.v64i3.1022.
18. Kothapalli L. P., Inamdar A. A., Nanda R. K., Thomas A. B. Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of Pantoprazole sodium sesquihydrate and Levosulpiride in a combined dosage form. *Int J Res Pharm Sci.* 2014; 4(4): 32–38.
19. Sour E., Ravari N. S., Alvandifar F. et al. Validated Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Pantoprazole in the Presence of Its Degradation Products. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2010; 3(4): 879–884.
20. Mishra P. K., Upadhyay S., Tripathi A. C., Saraf S. K. Stability Indicating HPLC-UV Method for Simultaneous Estimation of Pantoprazole, Domperidone and Drotaverine. *Int. J. PharmTech Res.* 2015; 8(5): 912–923.
21. Pandey S., Pandey P., Mishra D., Singh U. K. A validated stability indicating HPLC method for the determination of process-related impurities in pantoprazole bulk drug and formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 49(1): 175–184. DOI: 10.1590/s1984-82502013000100019.
22. Sree J. V., Rajappan M., Kannappan V. Stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pantoprazole, rabeprazole, lansoprazole and domperidone from their combination dosage forms. *International Journal of Drug Development & Research*. 2011; 3(4): 323–335.

REFERENCES

1. Pantoprazole. Available at: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2670.htm (accessed 03.12.2019) (in Russ.).
2. Priya D. S., Prashanthi K., Parijatha B., Mohan C. K. Validation of stability indicating LC-MS assay method for determination of pantoprazole sodium sesquihydrate. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2017; 6(1): 1413–1426.
3. The publication of the European Pharmacopoeia in Russian. VIIth ed. In 2 volumes. M.: OOO «Remedium». 2011: 4504 (in Russ.).



3 АПРЕЛЯ, МОСКВА
Третья конференция
«ИНФОРМАЦИОННЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ
В ФАРМАЦЕВТИКЕ»

+7 (495) 971-92-18,
events@cfo-russia.ru.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-55-59>
УДК 543.4



Оригинальная статья/Research article

Идентификация нестероидных противовоспалительных средств методом цифровой цветометрии с применением способа главных компонент

А. А. Чапленко^{1,2}, О. В. Моногарова^{1*}, К. В. Осолок¹

1 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), химический факультет, кафедра аналитической химии. 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, ГСП-1, д. 1, стр. 3

2 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 6

*Контактное лицо: Моногарова Оксана Викторовна. E-mail: o_monogarova@mail.ru

Статья получена: 20.12.2019. Статья принята к печати: 03.02.2020

Резюме

Введение. Цифровая цветометрия – один из доступных и простых методов, которые можно применять для экспрессного выявления недоброкачественных лекарственных средств. Главным ограничением метода является его недостаточная селективность. Для повышения селективности предложено использование молекулярных сенсоров – веществ, изменяющих окраску при физико-химическом взаимодействии с аналитом. Цифровой цветометрический анализ с использованием набора сенсоров, позволяет получить большой объем информации об образце, однако такое значительное число данных довольно сложно интерпретировать и использовать для экспрессной оценки состава препарата. Кроме того, применение большого набора сенсоров существенно увеличивает уровень информационного шума. Для уменьшения влияния шумовой составляющей, а также для сокращения размерности данных целесообразно применение хемометрических алгоритмов, в частности, метода главных компонент (principal component analysis, PCA). Показано, что использование PCA позволит заменить 24 значения светлот цветных каналов 2-3 численными величинами главных компонент без потери аналитической информации.

Цель. Цель исследования – разработка нового способа идентификации нестероидных противовоспалительных средств методом мультисенсорной цифровой цветометрии с использованием способа главных компонент.

Материалы и методы. Анализ проводили в прозрачных 96-луночных планшетах из полипропилена с плоским дном (Thermo Fischer Scientific, США, кат. № 430341). В лунки планшета последовательно вносили по 100 мкл соответствующего сенсора и по 100 мкл спиртовых растворов субстанций нестероидного противовоспалительного средства. В отдельный ряд лунок для сравнения вносили растворы сенсоров без добавления растворов субстанции (интактные лунки). После добавления растворов субстанции планшет заклеивали пленкой, встряхивали на планшетном шейкере PST-100HL (BioSan, Латвия) в течение 5 минут и оставляли на 20 минут для завершения протекания реакций. Для получения растровых изображений применяли офисный планшетный сканер Epson Perfection 1670 (CCD-матрица) со съемной крышкой. В качестве аналитического сигнала использовали разность светлот цветовых каналов между лункой с аналитом и интактной лункой. Полученные цифровые изображения ячеек обрабатывали в программе ImageJ с использованием цветовой модели RGB 24 bit (8 бит на канал).

Результаты и обсуждение. Показано, что использование хемометрических алгоритмов для обработки результатов мультисенсорного цветометрического анализа позволяет задействовать в получении аналитической информации весь массив данных, а не только значения светлот отдельных каналов некоторых сенсоров. Метод главных компонент позволяет одновременно избавиться от шумовой составляющей цветометрического сигнала и выделить наиболее чувствительные для данного образца сенсоры. Адекватность предложенного комбинированного подхода подтверждена при идентификации действующих веществ в 5 препаратах группы нестероидных противовоспалительных средств.

Заключение. Предложенный в настоящей работе подход можно с успехом применять в качестве экспрессного и доступного способа оценки подлинности препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств.

Ключевые слова: цифровая цветометрия, метод главных компонент, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота, парацетамол, ибупрофен, ацеклофенак.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. А. Чапленко самостоятельно выполнил эксперимент, математически обработал полученные данные и подготовил структуру статьи. О. В. Моногарова принимала основное участие в написании текста и оформлении статьи, в создании иллюстративного материала. К. В. Осолок предоставил полезные рекомендации по обработке результатов анализа с использованием хемометрических алгоритмов, редактировал текст статьи. Все авторы принимали активное участие в обсуждении результатов исследования.

Для цитирования: Чапленко А. А., Моногарова О. В., Осолок К. В. Идентификация нестероидных противовоспалительных средств методом цифровой цветометрии с применением способа главных компонент. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 55–59.

Digital Colorimetry of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: Identification Using Principal Component Method

Alexander A. Chaplenko^{1,2}, Oksana V. Monogarova^{1*}, Kirill V. Oskolok¹

1 – Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Division of Analytical Chemistry, 1/3, GSP-1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 6, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

*Corresponding author: Oksana V. Monogarova. E-mail: o_monogarova@mail.ru

Received: 20.12.2019. Accepted: 03.02.2020

Abstract

Introduction. Digital colorimetry is one of the available and simple methods that can be used for the rapid detection of low-quality drugs. The main limitation of the method is its lack of selectivity. To increase the selectivity, the use of molecular sensors is proposed. Molecular sensors are substances that change color during physicochemical interaction with the analyte. Digital colorimetric analysis using a set of sensors allows one to

© Чапленко А. А., Моногарова О. В., Осолок К. В., 2020

© Chaplenko A. A., Monogarova O. V., Oskolok K. V., 2020

obtain a large amount of information about the sample, however, such a significant amount of data is rather difficult to interpret and use for rapid assessment of the composition of the drug. In addition, the use of a large set of sensors significantly increases the level of information noise. To reduce the influence of the noise component, as well as to reduce the dimensionality of the data, it is advisable to use chemometric algorithms, in particular, the method of principal components (principal component analysis, PCA). It is shown that the using of PCA will make it possible to replace 24 values of the luminosity of color channels with 2-3 numerical values of the main components without loss of analytical information.

Aim. Aim of our investigation is the development of a new approach to identifying non-steroidal anti-inflammatory drugs using multisensory digital colorimetry by the principal component method.

Materials and methods. The analysis was performed in 96-well transparent polypropylene plates with flat bottom (*Thermo Fischer Scientific*, USA, № 430341). 100 µl of the corresponding sensor and 100 µl of alcohol solutions of non-steroidal anti-inflammatory substance sub-stances were consistently added to the wells of the plate. Sensor solutions were added to a separate row of wells for comparison without adding substance solutions (intact wells). After adding solutions of the substance, the plate was sealed with a film, shaken on a *PST-100HL* plate shaker (*BioSan*, Latvia) for 5 minutes and left for 20 minutes to complete the reaction. To obtain raster images an *Epson Perfection 1670* office flatbed scanner (CCD matrix) with a removable cover was used. The difference in the lightness of the color channels between the analyte well and the intact well was used as an analytical signal. The obtained digital images of the cells were processed in the *ImageJ* program using the *RGB 24 bit* color model (8 bits per channel).

Results and discussion. It is shown that the use of chemometric algorithms for processing the results of multisensor colorimetric analysis allows to use the entire data array in obtaining analytical information, and not just the lightness values of individual channels of some sensors. The method of principal components allows you to simultaneously get rid of the noise component of the colorimetric signal and highlight the most sensitive sensors for this sample. The adequacy of the proposed combined approach is confirmed by the identification of active sub-stances in 5 drugs of the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Conclusion. The approach proposed in this work can be successfully applied as an express and available way to assess the authenticity of medications of the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Keywords: digital colorimetry, principal component method, salicylic acid, acetylsalicylic acid, paracetamol, ibuprofen, aceclofenac.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Alexander A. Chaplenko independently performed the experiment, mathematically processed the data obtained and prepared the structure of the article. Oksana V. Monogarova participated in the writing of the text and the design of the article, the creation of illustrative material. Kirill V. Oskolok provided useful recommendations for processing analysis results using chemometric algorithms, edited the text of the article. All authors took an active part in the discussion of the results of the study.

For citation: Chaplenko A. A., Monogarova O. V., Oskolok K. V. Digital colorimetry of non-steroidal anti-inflammatory drugs: identification using principal component method. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 55–59.

ВВЕДЕНИЕ

Химическая цветометрия – один из доступных и простых методов, который можно применять для экспрессного выявления недоброкачественных лекарственных средств [1]. В фармацевтическом анализе этот метод также широко применяют для определения биологически активных веществ и лекарственных средств как по их собственной окраске, так и по окраске продуктов цветных реакций, используемых в фармакопейных тестах [2], для определения белизны порошков и таблеток [2], при анализе лекарственного растительного сырья [3, 4] и т. п.

Появление и широкое распространение в последние 20 лет доступных цифровых гаджетов (планшетных сканеров, цифровых фотокамер и др.) привело к появлению нового направления, сочетающего преимущества инструментальной цветометрии (высокую чувствительность и точность) с предельно низкой стоимостью и технической простотой визуальной цветометрии. Речь идёт о методе цифровой цветометрии на основе доступной бытовой и офисной техники. Эти устройства не относятся к специализированным средствам измерения, они доступны, имеют невысокую стоимость [5, 6]. К достоинствам указанного метода также следует отнести простоту, экспрессность, достаточно высокую чувствительность и точность, возможность проведения не только полуколичественного, но и количественного анализа [5, 6].

Несмотря на очевидные преимущества, цветометрический метод имеет некоторые ограничения, к главным из которых следует отнести низкую селективность [7]. Для повышения селективности метода предложено использование молекулярных сенсоров [8, 9]. В качестве сенсоров целесообразно применять ячейку из нескольких хромогенных агентов, в которой одновременно можно провести серию аналитических реакций. Метод мультисенсорной цветометрии [10] основан на получении окрашенных продуктов взаимодействия аналита с молекулярными сенсорами, извлечении информации об их цветовых характеристиках и последующем преобразовании в дискретный «штрих-код» вещества, который можно использовать для фармацевтического анализа [11].

Цифровой цветометрический анализ с использованием набора сенсоров, позволяет получить большой объём информации об образце, однако такое значительное число данных довольно сложно интерпретировать и использовать для экспрессной оценки состава препарата. Ранее нами был предложен вариант сокращения массива данных до бинарного «штрих-кода», каждый бит которого соответствует определённому цветовому каналу (*R*, *G* или *B*) одного из восьми сенсоров [11]. Способ обработки информации подобран таким образом, чтобы обеспечить наилучшую воспроизводимость и уникальность кода.

Однако при его формировании не учитывается, что данные, полученные от различных сенсоров, несут не одинаковую информационную нагрузку, кроме того, порог «0/1» выбран искусственно для данного конкретного набора лекарств и при анализе других препаратов его применение может быть некорректным.

Данные, полученные при анализе образцов методом мультисенсорной цифровой цветометрии, можно представить в виде своеобразного «цветометрического спектра» – зависимости разности светлот от номеров соответствующих цветовых каналов и молекулярных сенсоров (рисунок 1).

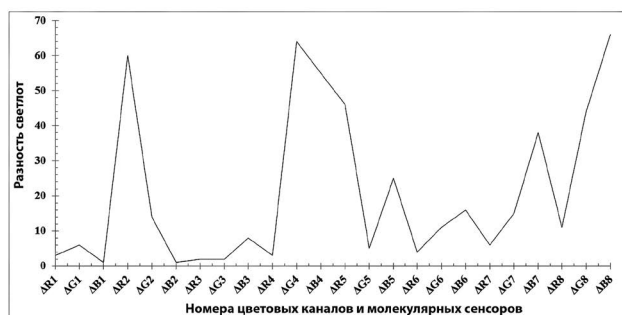


Рисунок 1. «Цветометрический спектр» парацетамола

Figure 1. «Colorimetric spectrum» of paracetamol

Установление качественного состава и, в целом, подлинности лекарственного средства можно провести при сравнении формы и положения максимумов «спектра». Недостатком этого подхода является сложность формализации критериев подлинности препарата, поскольку сходство формы спектра является субъективным показателем, особенно учитывая значительную шумовую составляющую спектра (связанную с методологическими ограничениями способа). Для уменьшения влияния уровня шума, а также для сокращения размерности данных целесообразно применение хемометрических алгоритмов, в частности, метода главных компонент (principal component analysis, PCA). Использование PCA позволит заменить 24 значения светлот цветных каналов 2-3 численными величинами главных компонент без потери аналитической информации.

Целью настоящего исследования является разработка нового способа идентификации нестероидных противовоспалительных средств методом мультисенсорной цифровой цветометрии с использованием способа главных компонент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для реализации предложенного подхода использовали фармацевтические субстанции салициловой кислоты (АО «Усолье-Сибирский химфармзавод», Россия, серия 10317, срок годности до 04.2022), ацетилсалициловой кислоты («Shandong Xinhua Pharmaceutical», Китай, серия 61209005, срок годности 07.2020),

парацетамола («Farmson Pharmaceuticals Guj. Pvt. Ltd.», Индия, серия FP-171677, срок годности 07.2022), ибупрофена («BASF Corporation», США, серия IB1Z0839, срок годности 07.2021) и ацеклофенака («Amoli Organics», Индия, серия ACE/1708/0060A, срок годности 07.2022).

В качестве молекулярных сенсоров применяли: C_1 – 96 % (v/v) водный раствор этанола х.ч. (ООО «Евротрейд», Россия); C_2 – 1 mM спиртовой раствор антрахинонового зеленого ч.д.а. (Supelco, Тайвань, кат. № 88996); C_3 – 0,2 % водный раствор 3-метилбензотиазолионгидразона (MBTH) ч.д.а. (Merck, Германия, кат. № L499765); C_4 – 0,2 % водный раствор метилоранжа ч.д.а. (Supelco, Тайвань, кат. № 1013220025); C_5 – 1 mM спиртовой раствор сульфородамина В х.ч. (Sigma-Aldrich, США, кат. № S9012); C_6 – 1 mM спиртовой раствор 1-гидроксипирена ч.д.а. (Sigma-Aldrich, США, кат. № 361518); C_7 – 1 mM спиртовой раствор красного очаровательного АС ч.д.а. (Supelco, Тайвань, кат. № 38213); C_8 – 1 mM водный раствор $FeCl_3$ х.ч. (АО «Ленреактив», Россия, кат. № 373266).

Анализ проводили в прозрачных планшетах из полипропилена с плоским дном, объем лунки – 350 мкл (Thermo Fischer Scientific, США, кат. № 430341). В лунки планшета последовательно вносили по 100 мкл соответствующего сенсора и по 100 мкл спиртовых растворов субстанций салициловой кислоты, ацетилсалициловой кислоты, парацетамола, ибупрофена и ацеклофенака. В отдельный ряд лунок для сравнения вносили растворы сенсоров без добавления растворов субстанции (интактные лунки). После добавления растворов субстанции планшет заклеивали пленкой, встряхивали на планшетном шейкере PST-100HL (BioSan, Латвия) в течение 5 минут и оставляли на 20 минут для завершения протекания реакций.

Для получения растровых изображений применяли офисный планшетный сканер Epson Perfection 1670 (CCD-матрица) со съемной крышкой. Сканирование планшета с образцами проводили с применением программы Epson Scan в режиме «Professional mode», разрешение 600 dpi, глубина цвета 24 bit. Параметры «Color restoration», «Unsharp mask filter» и «Descreening filter» – отключены. Для выполнения цифрового цветометрического анализа с использованием 96-луночного планшета (Thermo Fischer Scientific, США, кат. № 1256604) была изготовлена тефлоновая рамка-вкладыш размером 210 × 297 × 17 мм с центральным прямоугольным вырезом 128 × 86 мм, помещаемая под крышкой офисного планшетного сканера формата А4.

В качестве аналитического сигнала использовали разность светлот цветовых каналов между лункой с аналитом и интактной лункой. Полученные цифровые изображения ячеек обрабатывали в программе ImageJ с использованием цветовой модели RGB 24 bit (8 бит на канал), в каждой лунке выделяли центральную область и получали 3 усредненных значения светлоты – по одному для каждого цветового RGB-канала. Выбор цветовых каналов осуществляли эмпирически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для демонстрации преимуществ предложенного подхода были выбрано 5 препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) – салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота, парацетамол, ибупрофен и ацеклофенак. Согласно описанной нами ранее методике [11], методом мультисенсорной цифровой цветометрии проанализировано 12 образцов различных серий каждого из препаратов – итого 60 образцов. Полученные цветометрические данные были обработаны методом PCA (алгоритм NIPALS – Nonlinear Iterative Partial Least Squares), получены матрицы счетов и нагрузок.

Значения PC1 и PC2 были рассчитаны по следующим формулам:

$$\begin{aligned} PC1 = & 0,06 \cdot \Delta R_1 - 0,27 \cdot \Delta G_1 - 0,13 \cdot \Delta B_1 + \\ & + 0,06 \cdot \Delta R_2 + 0,19 \cdot \Delta G_2 + 0,19 \cdot \Delta B_2 - 0,13 \cdot \Delta R_3 + \\ & + 0,01 \cdot \Delta G_3 - 0,22 \cdot \Delta B_3 - 0,06 \cdot \Delta R_4 + 0,28 \cdot \Delta G_4 + \\ & + 0,28 \cdot \Delta B_4 - 0,28 \cdot \Delta R_5 - 0,13 \cdot \Delta G_5 + 0,28 \cdot \Delta B_5 - \\ & - 0,25 \cdot \Delta R_6 - 0,19 \cdot \Delta G_6 - 0,26 \cdot \Delta B_6 + 0,24 \cdot \Delta R_7 + \\ & + 0,2 \cdot \Delta G_7 + 0,08 \cdot \Delta B_7 + 0,21 \cdot \Delta R_8 - 0,24 \cdot \Delta G_8 + 0,24 \cdot \Delta B_8, \\ PC2 = & 0,12 \cdot \Delta R_1 - 0,04 \cdot \Delta G_1 + 0,13 \cdot \Delta B_1 - 0,37 \cdot \Delta R_2 + \\ & + 0,28 \cdot \Delta G_2 + 0,27 \cdot \Delta B_2 + 0,24 \cdot \Delta R_3 + 0,37 \cdot \Delta G_3 + \\ & + 0,23 \cdot \Delta B_3 - 0,10 \cdot \Delta R_4 - 0,07 \cdot \Delta G_4 - 0,02 \cdot \Delta B_4 + \\ & + 0,05 \cdot \Delta R_5 - 0,33 \cdot \Delta G_5 + 0,01 \cdot \Delta B_5 + 0,14 \cdot \Delta R_6 - \\ & - 0,25 \cdot \Delta G_6 + 0,14 \cdot \Delta B_6 + 0,04 \cdot \Delta R_7 + 0,26 \cdot \Delta G_7 - \\ & - 0,11 \cdot \Delta B_7 + 0,23 \cdot \Delta R_8 - 0,17 \cdot \Delta G_8 - 0,20 \cdot \Delta B_8. \end{aligned}$$

На рисунке 2 в виде точечной диаграммы представлены значения PC1 и PC2 для всех образцов.

Можно заметить, что точки, соответствующие образцам одного и того же препарата, формируют группы, в которых внутригрупповое расстояние в тысячи раз меньше межгруппового. Для идентификации лекарственных средств представленные данные могут быть кластеризованы с помощью плоских (неиерархических) и четких (непересекающихся) алгоритмов, например, алгоритма k-средних (число кластеров задают по числу анализируемых лекарственных препаратов).

Однако для использования в химическом анализе цифровой цветометрии в комбинации с PCA NIPALS необходимо обозначить критерий отнесения анализируемого образца к конкретному лекарственному препарату. Рассмотрим возможный подход к решению данной задачи на примере обучающей выборки образцов ацетилсалициловой кислоты (рисунок 3). На первом этапе определяют геометрический центр обучающей выборки (обозначена на рисунке 3 ром-

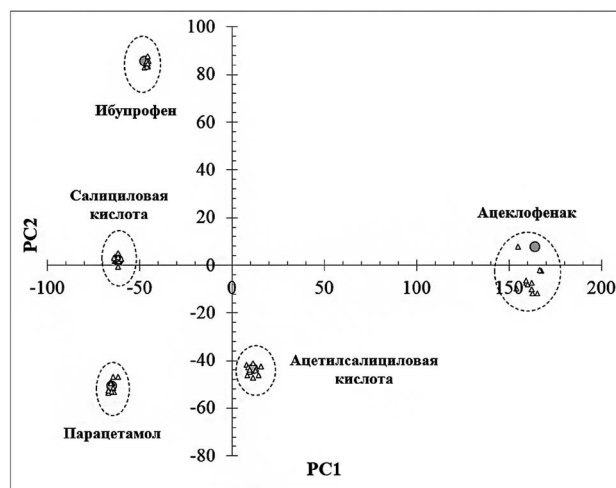


Рисунок 2. Результаты обработки цветометрических данных для образцов НПВС методом PCA NIPALS. Круглые символы соответствуют данным для стандартных образцов, треугольные – для 12 анализируемых лекарственных препаратов

Figure 2. Results of processing colorimetric data for NSAID samples by PCA NIPALS. Round symbols correspond to the data for standard samples, triangular symbols correspond to 12 analyzed drugs

бами), затем – доверительный интервал ($P = 0,95$) для величин PC1 и PC2. Таким образом, точки испытуемых образцов, попавшие в область доверительного интервала (обозначен на рисунке 3 серым кругом), с вероятностью 95 % соответствуют препарату ацетилсалициловой кислоты.

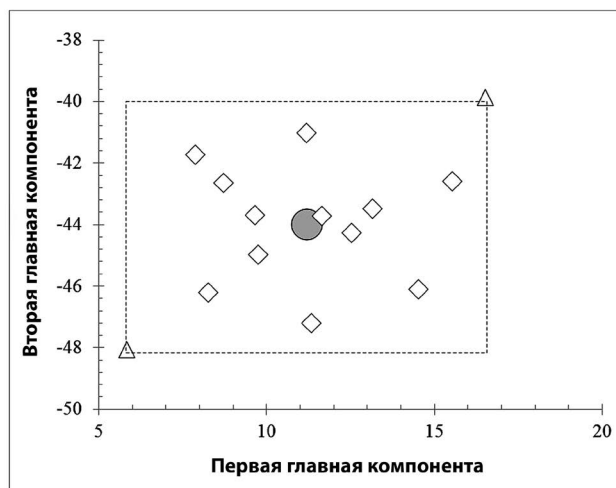


Рисунок 3. Оценка подлинности образцов препарата «Аспирин»

Figure 3. Evaluation of the authenticity of samples of the drug «Aspirin»

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование хеометрических алгоритмов для обработки результатов мультисенсорного цветометрического анализа позволяет задействовать в получении аналитической информации весь массив дан-

ных, а не только значения светлот отдельных каналов некоторых сенсоров. Метод главных компонент позволяет одновременно избавиться от шумовой составляющей цветометрического сигнала и выделить наиболее чувствительные для данного образца сенсоры. Предложенный в настоящей работе подход можно с успехом применять в качестве экспрессного и доступного способа оценки подлинности препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств при проведении выборочного контроля качества лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моногарова О. В., Чапленко А. А., Осолок К. В. Идентификация и определение левомицетина в лекарственных препаратах методом мультисенсорной цифровой цветометрии. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2020; 61(1).
2. Рудакова Л. В., Васильева А. П., Шведов Г. И., Поплавская Е. В. Цифровые технологии для определения цветности и белизны лекарственных средств. *Фармацевтические технологии и упаковка*. 2012; 215(2): 38–40.
3. Погоцкая А. А., Бузук Г. Н. Применение сканера и компьютерных программ цифровой обработки изображений для количественного определения алкалоидов в листьях макалей сердцевидной. *Вестник фармации*. 2009; 46(4): 32–38.
4. Ершик О. А., Бузук Г. Н. Применение сканера и компьютерных программ цифровой обработки изображений для количественного определения фенольных соединений корневищ с корнями сабельника болотного. *Вестник фармации*. 2008; 42(4): 6–12.
5. Апыри В. В., Горбунова М. В., Исаченко А. И., Дмитриенко С. Г., Золотов Ю. А. Использование бытовых цветорегистрирующих устройств в количественном химическом анализе. *Журнал аналитической химии*. 2017; 72(11): 963–977. Doi: 10.7868/S0044450217110019
6. Моногарова О. В., Осолок К. В., Апыри В. В. Цветометрия в химическом анализе. *Журнал аналитической химии*. 2018; 73(11): 857–867. Doi: 10.1134/S0044450218110063
7. Химченко С. В., Экспериандова Л. П. Цветометрия в инструментальном и визуальном тест-анализе. *Lambert Academic Publishing*. 2014: 220.
8. Ушаков Е. Н., Алфимов М. В., Громов С. П. Принципы дизайна оптических молекулярных сенсоров и фотоуправляемых рецепторов на основе краун-эфиров. *Успехи химии*. 2008; 77 (1): 39–59.
9. Kangas M. J., Wilson K. L., Burks L. M., Atwater J., Lukowicz R. M., Garver B., Mayer M., Havenridge S., Holmes A. E. An improved comparison of chemometric analysis for the identification of acids and bases with colorimetric sensor arrays. *International Journal of Chemistry*. 2018; 10: 36–55. Doi:10.5539/ijc.v10n2p36
10. Feng L., Musto C. J., Kemling J. W., Lim S. H., Zhong W., Suslick K. S. Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals. *Analytical Chemistry*. 2010; 82(22): 9433–9440. Doi: 10.1021/ac1020886
11. Monogarova O. V., Chaplenko A. A., Oskolok K. V. Multisensory digital colorimetry to identify and determination of active substances in drugs. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2019; 299: 126909. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126909.
3. Pogotskaya A. A., Buzuk G. N. The use of a scanner and computer programs for digital image processing for the quantitative determination of alkaloids in the leaves of the cordata macalea. *Bulletin of pharmacy*. 2009; 46(4): 32–38 (in Belarus).
4. Ershik O. A., Buzuk G. N. The use of a scanner and computer programs for digital image processing for the quantitative determination of phenolic compounds of rhizomes with roots of the marsh saber. *Bulletin of pharmacy*. 2008; 42(4): 6–12 (in Belarus).
5. Apyari V. V., Gorbunova M. V., Isachenko A. I., Dmitrienko S. G., Zolotov Yu. A. Use of household color-recording devices in quantitative chemical analysis. *Journal of Analytical Chemistry*. 2017; 72(11): 963–977. Doi: 10.7868/S0044450217110019 (in Russ.).
6. Monogarova O. V., Oskolok K. V., Apyari V. V. Colorimetry in chemical analysis. *Journal of Analytical Chemistry*. 2018; 73(11): 857–867. Doi: 10.1134/S0044450218110063 (in Russ.).
7. Khimchenko S. V., Eksperiandova L. P. Colorimetry in instrumental and visual test analysis. *Lambert Academic Publishing*. 2014: 220 (in Russ.).
8. Ushakov E. N., Alfimov M. V., Gromov S. P. Design principles of optical molecular sensors and photo-controlled receptors based on crown ethers. *The success of chemistry*. 2008; 77(1): 39–59 (in Russ.).
9. Kangas M. J., Wilson K. L., Burks L. M., Atwater J., Lukowicz R. M., Garver B., Mayer M., Havenridge S., Holmes A. E. An improved comparison of chemometric analysis for the identification of acids and bases with colorimetric sensor arrays. *International Journal of Chemistry*. 2018; 10: 36–55. Doi:10.5539/ijc.v10n2p36
10. Feng L., Musto C. J., Kemling J. W., Lim S. H., Zhong W., Suslick K. S. Colorimetric sensor array for determination and identification of toxic industrial chemicals. *Analytical Chemistry*. 2010; 82(22): 9433–9440. Doi: 10.1021/ac1020886
11. Monogarova O. V., Chaplenko A. A., Oskolok K. V. Multisensory digital colorimetry to identify and determination of active substances in drugs. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2019; 299: 126909. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126909.

REFERENCES

1. Monogarova O. V., Chaplenko A. A., Oskolok K. V. Identification and determination of chloramphenicol in drugs by multisensor digital colorimetry. *Bulletin of Moscow University. Series 2: Chemistry*. 2020; 61(1) (in Russ.).
2. Rudakova L. V., Vasilieva A. P., Shvedov G. I., Poplavskaya E. V. Digital technologies for determining the color and whiteness of drugs. *Pharmaceutical technology and packaging*. 2012; 215(2): 38–40 (in Russ.).

Оригинальная статья/Research article

Валидация методики определения микропримесей ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии

Н. О. Ким^{1*}, Е. А. Ивановская¹

1 – ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России), 630091, Россия, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, д. 52

*Контактное лицо: Ким Надежда Олеговна. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru

Статья получена: 07.10.2019. Статья принята к печати: 05.02.2020

Резюме

Введение. В статье представлены результаты валидации разработанной нами методики – инверсионной вольтамперометрии (ИВА) – по определению примеси ртути в лекарственном препарате протамин сульфат. Оценили показатели правильности и прецизионности (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), специфичности и определили предел количественного определения (ПКО). Для подтверждения правильности и специфичности результатов методики ИВА было определено содержание ртути в протамине сульфата следующими методами: атомно-адсорбционной спектроскопией (ААС), рентгенфлуоресцентной спектрометрией (РФС) и фармакопейным методом, согласно Европейской фармакопеи.

Цель. Валидация разработанной нами методики (метод инверсионной вольтамперометрии) определения микропримеси ртути в протамине сульфата.

Материалы и методы. Протамин сульфат раствор для инъекций 10 мг/мл (производитель – ОАО «Новосибхимфарм», г. Новосибирск, Россия) был взят в качестве объекта исследования. Методика инверсионной вольтамперометрии была разработана на полуавтоматическом анализаторе ТА-4 (ООО НПФ «Томьаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте. Атомно-адсорбционная спектроскопия была выполнена в институте неорганической химии им. А. В. Николаева (ИНХ СО РАН). Рентген – флуоресцентный анализ выполнен на базе ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный университет». Определение ртути фармакопейным методом проводили совместно с ОАО «Новосибхимфарм».

Результаты и обсуждение. Провели валидацию разработанной методики на правильность и повторяемость. Повторяемость оценивали по 10-ти измерениям, коэффициент вариации составил 7,8. Провели проверку внутрилабораторной прецизионности по 6-ти измерениям, коэффициент вариации составил 7,9 и 7,4 у аналитика № 1 и аналитика № 2 соответственно. Согласно нашей методики содержание ртути в протамине сульфата составляет 0,03 ppm. Сравнили результаты с другими методами определения ртути в органических объектах. При определении ртути методом ААС результат получился ≤0,5 ppm, при РФС – 0,1 ppm. Результаты фармакопейного метода нельзя считать достоверными ввиду отсутствия повторяемости и воспроизводимости.

Заключение. Провели валидацию разработанной нами ранее методики определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. Результаты нашей методики сопоставимы с результатами других методов анализа, таких как ААС и РФС. Разработанная нами методика может быть использована для контроля качества этого лекарственного препарата.

Ключевые слова: инверсионная вольтамперометрия, валидация метода, протамин сульфат.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. А. Ивановская придумала эксперимент. Н. О. Ким разработала методику определения ртути в протамине сульфата, провела валидацию методики, обработку данных. Е. А. Ивановская, Н. О. Ким проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Ким Н. О., Ивановская Е. А. Валидация методики определения микропримесей ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 60–64.

Validation of Method for Mercury Impurities Determination in Protamine Sulfate by Stripping Voltammetry

Nadezhda O. Kim^{1*}, Elena A. Ivanovskaja¹

1 – Novosibirsk State Medical University NOVOSIBSMU, 52, Krasny prospect, Novosibirsk, 630091, Russia

*Corresponding author: Nadezhda O. Kim. E-mail: Kim_Nadia@mail.ru

Received: 07.10.2019. Accepted: 05.02.2020

Abstract

Introduction. The article presents the results of the validation of our developed method – stripping voltammetry (SVA) used for mercury impurities determination in protamine sulfate. Procedure was validated in terms of specificity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), and LLOQ. To confirm the results of the SVA method, we choose as comparative analyzes for mercury content determination in protamine sulfate generally accepted methods: atomic absorption spectroscopy (AAS), X-ray fluorescence spectrometry (XRF), and the pharmacopeia method according to the European Pharmacopoeia.

Aim. Validation of method developed for mercury impurities determination in protamine sulphate by stripping voltammetry.

Materials and methods. Protamine sulfate solution for injection 10 mg/mL (Novosibhimpharm, Novosibirsk, Russia) was used as a study object. The method of stripping voltammetry was performed at TA-4 semi-automatic analyzer (Tomanalit, Tomsk) with VALabTx software included. At the A. V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry (Institute of Inorganic Chemistry SB RAS) atomic absorption spectroscopy was performed. At the Pacific State University was carried out X-ray fluorescence spectrometry. We carried out the pharmacopeia method in conjunction with «Novosibhimpharm» factory.

Results and discussion. We validated the developed method for accuracy and precision. We evaluated the repeatability by 10 measurements; the coefficient of variation was 7.8. We tested the intermediate precision for six measurements; the coefficient of variation was 7.9 and 7.4 for analyst № 1 and analyst № 2, respectively. According to our methodology, the mercury impurities content in protamine sulfate is 0.03 ppm. We compared our results with other generally accepted methods for the mercury determination in organic objects. When determining mercury by the AAS method, the result was ≤ 0.5 ppm, with XRF – 0.1 ppm. Pharmacopeia method results cannot be reliable due to the lack of repeatability.

Conclusion. We validated the previously developed method for mercury impurities determination in protamine sulfate by stripping voltammetry. The results of our method are comparable with the results of other methods, such as AAS and XRF. That Therefore stripping voltammetry can be used in quality control of protamine drug products.

Keywords: stripping voltammetry, mercury, validation of the method, protamine sulfate.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena A. Ivanovskaja invented the experiment. Nadezhda O. Kim developed the method, held the validation. Elena A. Ivanovskaja, Nadezhda O. Kim held results interpretation. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Kim N. O., Ivanovskaja E. A. Validation of method for mercury impurities determination in protamine sulfate by stripping voltammetry. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 60–64.

ВВЕДЕНИЕ

Аналитические методы широко применяются на всех стадиях разработки лекарственных средств (ЛС), включая синтетические, технологические, биофармацевтические, фармакокинетические исследования. Этап перехода к промышленному производству сопровождается адаптацией разработанных методик к условиям фармацевтического предприятия, а также проверки стабильности основных показателей качества на опытно-промышленных сериях ЛС [1]. Определение токсических элементов в ЛС органического происхождения в наше время является актуальной проблемой. Ртуть относится к таким элементам [2]. Согласно Европейской фармакопеи (Ph. Eur.) [3] протамина сульфат состоит из сульфатов основных пептидов, извлеченных из спермы или икры рыб, обычно видов *Salmonidae* и *Clupeidae*. На сегодняшний день протамины – это единственные препараты, которые используют в медицинской практике для нейтрализации гепарина [4], и благодаря этому свойству протамин используется в кардиохирургии, сосудистой хирургии и интервенционных радиологических процедурах [5]. Согласно нормативной документации (сертификат анализа) в субстанции протамина содержится примесь ртути (количество которой не должно превышать 10 ppm). В связи с этим нами была разработана методика для определения примеси ртути методом инверсионной вольтамперометрии. Каждая новая методика требует валидации и подтверждения.

Проведя литературный обзор по существующим методам определения ртути в ЛС, остановились на трех методах для проверки правильности нашей методики.

Фармакопейный метод – экстракционно-фотолориметрический, основанный на использовании при определении ртути дитизона для количественного определения данного элемента в биологических объ-

ектах с образованием желто-оранжевого комплекса ртуть(II)-иона с дитизоном и последующим спектрофотометрическим определением [6].

Атомно-адсорбционная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (метод «холодного пара»). Метод заключается в восстановлении ионов ртути до металлической ртути, получении с помощью генератора атомного пара паров ртути, последующей их отгонке потоком воздуха или инертного газа в абсорбционную ячейку атомно-абсорбционного спектрометра. Концентрацию паров ртути определяют по резонансному абсорбционному поглощению УФ-света с длиной волны 253,7 нм от ртутной лампы [7].

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) – позволяет определять концентрацию элементов от Be (№ 4) до U (№ 92) в диапазоне от ppm до 100 % в различных веществах и материалах. Метод основан на зависимости интенсивности рентгеновского излучения от концентрации элемента в образце. В работе используются волнодисперсионные спектрометры с флуоресцентным излучением, которое разлагается в спектр при помощи кристаллов-монокроматоров, а затем детектируется и количественно измеряется его интенсивность [8].

Цель исследования. Валидация разработанной нами методики определения примеси ртути в растворе протамина сульфата инверсионной вольтамперометрией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили протамины сульфат раствор для инъекций 10 мг/мл. Производитель ОАО «Новосибхимфарм» (г. Новосибирск).

Методику определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии разработали на электрохимическом анализаторе ТА-4 (ООО НПП «Томъаналит», г. Томск) с программным обеспечением VALabTx в комплекте.

Для проверки специфичности и правильности разработанной методики использовали атомно-адсорбционную спектроскопию (метод «холодного пара»), рентгенофлуоресцентную спектрометрию и фармакопейный метод.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования является бесцветная прозрачная жидкость раствор для инъекций протамин-сульфат с концентрацией 10 мг/мл. Ранее нами была разработана методика определения примеси ртути в протамине сульфата методом инверсионной вольтамперометрии. Установлены параметры измерения: время растворения – 10 с, время накопления – 80 с, уровень вибрации на этапе накопления – 9 с, время успокоения – 5 с. Содержание ртути рассчитывается автоматически по формуле:

$$C_{\text{в пробе}} = \frac{I_{\text{пробы}} \cdot C_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{добавки}} \cdot V_{\text{минерализата}}}{(I_{\text{проба с добавкой}} - I_{\text{проба}}) \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot M_{\text{навески}}},$$

где $I_{\text{пробы}}$ – высота пика элемента на кривой пробы, мкА; $C_{\text{добавки}}$ – концентрация аттестованного раствора, мг/л; $V_{\text{добавки}}$ – объем добавки, мл; $V_{\text{минерализата}}$ – объем минерализата, мл; $I_{\text{проба с добавкой}}$ – высота пика элемента на кривой пробы с добавкой, мкА; $V_{\text{аликвоты}}$ – объем аликвоты, мл; $M_{\text{навески}}$ – величина навески, г или мл.

Валидацию разработанной методики провели в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи (ГФ) по ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [9]. При валидации методики количественного определения примесей должны быть обязательно проверены показатели специфичности и ПКО.

Для определения специфичности и правильности методики мы сравнили полученные нами результаты с результатами, выданными методами атомно-адсорбционной спектрометрии (являющейся заведомо специфичной для определения примесей ртути согласно ОФС 1.2.2.2.005.15), рентген-флуоресцентной спектрометрии и фармакопейного метода анализа.

Атомно-адсорбционный метод был выполнен в институте неорганической химии им. А. В. Николаева (ИНХ СО РАН). Содержание ртути в растворе серии 40216 составило $\leq 0,5$ ppm. Расчет производится автоматически. Погрешность определения ± 10 %.

Рентген – флуоресцентный анализ выполнен на базе ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный университет» на приборе «СПЕКТРОСКАН МАКС-GV». Содержание ртути в образце (раствор серии 40216) составило 0,0001 мас. % (0,1 ppm). Расчет производится автоматически. Погрешность метода варьируется в пределах 0,2–3 %. График с пиком ртути представлен на рисунке 1.

Фармакопейный метод выполняли совместно с ОАО «Новосибхимфарм». Согласно методики 2,0 г субстанции протамин-сульфата вносят в коническую

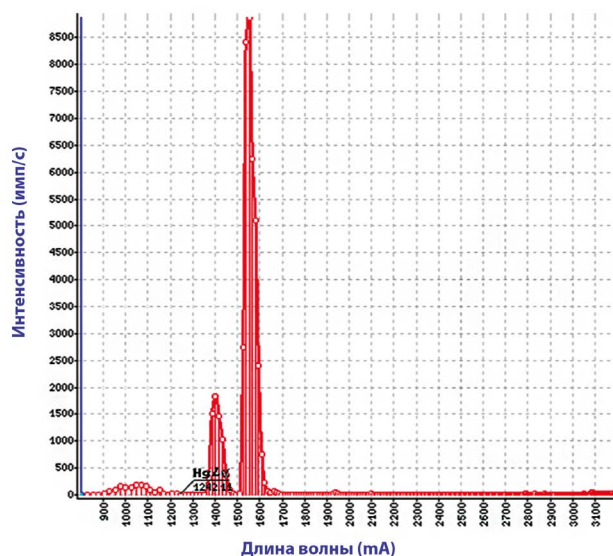


Рисунок 1. Спектр образца раствора серии 40216, полученный на спектрометре «SPECTROSCAN МАКС-GV»

Figure 1. The spectrum of a sample of a solution of the 40216 series obtained on the spectrometer «SPECTROSCAN MAX-GV»

колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 20 мл смеси, состоящую из равных объемов азотной концентрированной и серной концентрированной кислот, кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры и, с осторожностью прибавляют 100 мл воды. Кипятят до удаления азотных паров. Раствор охлаждают до комнатной температуры, осторожно прибавляют воды до 200 мл, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. 50 мл фильтрата помещают в делительную воронку, встряхивают с последовательно добавляемыми небольшими количествами хлороформа до обесцвечивания хлороформного слоя. Хлороформный слой отбрасывают. К водному слою прибавляют 25 мл серной кислоты разведенной, 115 мл воды и 10 мл раствора гидроксилламина гидрохлорида концентрацией 200 г/л. Полученный раствор титруют раствором дитизона R2, встряхивая 20 раз смесь после каждого добавления титранта, к концу титрования удаляют хлороформный слой и далее титруют до получения голубовато-зеленой окраски раствора. Рассчитывают содержание ртути, используя эквивалентное содержание ртути в мкг/мл титранта, определяемое по стандартному раствору дитизона R2.

Дитизона раствор R2 готовят следующим образом: растворяют 40,0 мг дитизона в хлороформе и прибавляют до 1000,0 мл тем же растворителем. Разводят 30,0 мл полученного раствора до 100,0 мл хлороформом [3]. Для минерализации протамин-сульфата использовали 80 мл формальдегида с помощью которого маскировались окислители. Спектр протамин-сульфата больше схож по конфигурации со спектрами эталонных растворов (есть отличие в гипсохромном сдвиге, сдвиге в длинноволновую область). Спектр «поднял-

ся» по оси ординат (ось оптической плотности) и расположился выше отрицательной области. Оптическая плотность в максимуме поглощения дитизоната ртути была чуть больше оптической плотности дитизоната ртути эталонного раствора, содержащего 15 мкг ионов ртути. Результаты по фармакопейному методу считать достоверными нельзя, так как отсутствует повторяемость и воспроизводимость этого метода.

Прецизионность оценивали в двух вариантах. Проверили повторяемость методики на растворе серии 40216. Оценку проводили по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории [9]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты повторяемости разработанной методики инверсионной вольтамперометрии

Table 1. Repeatability results of the developed inversion voltammetry technique

№ анализа	Содержание ртути, мг/л
1	0,00283
2	0,00275
3	0,00294
4	0,00253
5	0,00229
6	0,00292
7	0,00297
8	0,00252
9	0,00291
10	0,00271
Среднее значение, мг/л	0,00274
Стандартное отклонение	0,000214
Коэффициент вариации, %	7,8

В результате исследования коэффициент вариации составил меньше 10 %, что говорит о незначительной изменчивости вариационного ряда.

Внутрилабораторная прецизионность проверялась двумя аналитиками в разные дни по результатам 6-ти измерений. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что коэффициент вариации у двух разных аналитиков составил 7,9 и 7,5 %, что дает право утверждать, что методика валидирована по прецизионности.

Для определения предела количественного определения (ПКО) были приготовлены растворы с концентрацией от $1,0 \cdot 10^{-1}$ до $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л, путем разбавления в 10 раз. Анализ растворов проводили при стандартных условиях – время растворения 10 с, время накопления 60 с, время успокоения 5 с. В качестве добавки использовали раствор ртути с концентрацией 0,1 мг/л. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 2. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности

Table 2. The results of the determination of intralaboratory precision

	Образец	Содержание ртути, мг/л	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %
Аналитик № 1	1	0,00272	0,000198	7,9
	2	0,00218		
	3	0,00259		
	4	0,00270		
	5	0,00233		
	6	0,00240		
	Среднее (n = 6)	0,00249		
Аналитик № 2	1	0,00273	0,000180	7,5
	2	0,00253		
	3	0,00236		
	4	0,00218		
	5	0,00226		
	6	0,00241		
	Среднее (n = 6)	0,00241		

Таблица 3. Определение предела количественного определения

Table 3. The definition of the limit of quantification

Концентрация ртути в приготовленном растворе (проба), мг/л	Концентрация ртути, определяемая прибором, мг/л	Предел повторяемости, г, %	Ошибка
$1 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	0,0211	$\pm 0,03$
$1 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	0,00209	$\pm 0,003$
$1 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,000307	$\pm 0,0003$
$1 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,0000332	$\pm 0,00005$
$1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,00000103	$\pm 0,000004$
$1 \cdot 10^{-6}$	$1,25 \cdot 10^{-6}$	0,000000183	$\pm 0,0000005$
$1 \cdot 10^{-7}$	Сигнал не обнаружен		

Как следует из результатов, порядок определяемой концентрации стандартного раствора совпадает, а погрешность измерения составляет не более ± 20 %. При концентрации $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л пика ртути на вольтамперограмме нет. С уменьшением концентрации точность измерения уменьшается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные методом инверсионной вольтамперометрии, сопоставимы с результатами других аналитических методов, таких как ААС и РФС. Фармакопейный метод не имеет воспроизводимых результатов, поэтому его результаты не могут считаться

достоверным на данный момент. Согласно выполненной валидационной оценке, методика определения микропримесей ртути в протамине сульфата инверсионной вольтамперометрии является правильной, воспроизводимой и специфичной. Установили, что при концентрации $1,0 \cdot 10^{-7}$ мг/л пик ртути отсутствует на вольтамперограмме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев В. А., Федота Н. В., Горчаков Э. В. Фармацевтическая химия. Учебно-методическое пособие. АГРУС. 2013: 33.
2. Человек и среда его обитания. Хрестоматия. В. С. Петросян автор главы: ртуть и ее соединения в окружающей среде. *Мир*. 2003: 282–290.
3. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
4. Eirin-Lopez J. M., Lewis J. D., Howe I. A., Ausio J. Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes. *Mol Biol Evol*. 2006; 23: 1304–1317.
5. Van Den Bussche R. A., Hoofer S. R., Hansen E. W. Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine P1 gene. *Mol Phylogenetics Evol*. 2002, 22: 333–341.
6. Костенко Е. Е., Штокало М. И. Твердофазная спектрофотометрия – эффективный метод определения тяжелых металлов в пищевых объектах. *РЖ 19ГД. Аналитическая химия. Оборудование лабораторий*. 2005; 59(13): 1276–1282.
7. Спирова С. Н. Исследование содержания примесных элементов (кадмий, свинец, ртуть) в лекарственных средствах и сырье природного происхождения. *Автореферат дис. ... канд. фарм. н.: 15.00.02*. 1995: 24.
8. van Sprang H. A. Fundamental parameter methods in XRF spectroscopy. *Advances in X-ray Analysis*. 2000; 42.
9. Государственная фармакопея российской Федерации. Т. I. МЗСР РФ. 13-е изд. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2015: 1470.

REFERENCES

1. Belyaev V. A., Fedota N. V., Gorchakov E. V. Pharmaceutical Chemistry. Teaching aid. AGRUS. 2013: 33 (in Russ.).
2. Man and his environment. An anthology. V. S. Petrosyan author of the chapter: mercury and its compounds in the environment. *World*. 2003: 282–290 (in Russ.).
3. European Pharmacopoeia 8.0. Available at: <https://archive.org/stream/EuropeanPharmacopoeia80/European-Pharmacopoeia-8-0#page/n6/mode/2up>.
4. Eirin-Lopez J. M., Lewis J. D., Howe I. A., Ausio J. Common phylogenetic origin of protamine-like (PL) proteins and histone H1: Evidence from bivalve PL genes. *Mol Biol Evol*. 2006; 23: 1304–1317.
5. Van Den Bussche R. A., Hoofer S. R., Hansen E. W. Characterization and phylogenetic utility of the mammalian protamine P1 gene. *Mol Phylogenetics Evol*. 2002, 22: 333–341.
6. Kostenko E. E., Shtokalo M. I. Solid-phase spectrophotometry is an effective method for determining heavy metals in food objects. *RZh 19GD. Analytical chemistry. Laboratory equipment*. 2005; 59(13): 1276–1282 (in Russ.).
7. Spirova S. N. Investigation of the content of impurity elements (cadmium, lead, mercury) in medicines and raw materials of natural origin. *Abstract of the dissertation of the Cand. of Sci.: 15.00.02*. 1995: 24 (in Russ.).
8. van Sprang H. A. Fundamental parameter methods in XRF spectroscopy. *Advances in X-ray Analysis*. 2000; 42.
9. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. T. I. MHSD of the Russian Federation. 13th ed. *Scientific center for the examination of medical applications*. 2015: 1470 (in Russ.).

XI Практическая конференция PHARMAVBAND-2020

10 апреля 2020 г., Loft Hall, Москва



**Составьте свой маркетинг-микс
из эффективных инструментов продвижения!**

РЕАЛЬНО ИНТЕРАКТИВНЫЕ ФОРМАТЫ: challenge-сессия, фарм-баттл «Чужой против Хищника», мастер-класс и многое другое.

ПРАКТИКА: реальный опыт от лидеров мнений фарминдустрии.
БЕЗ РЕКЛАМЫ И ТЕОРЕТИЗИРОВАНИЙ!

БЕРИ И ПРИМЕНЯЙ: успехи и ошибки, инсайты и компромиссы в продвижении бренда, оценка эффективности каждого из каналов — опыт, который поможет вам оставаться лидером.

ПРОЛОНГИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ: Ваш билет включает в себя доступ к слайдам и записям презентаций докладчиков, которые вы можете использовать в своих маркетинговых инициативах круглый год.

Аудитория: директора бизнес-юнитов, директора по маркетингу и рекламе, бренд-менеджеры, директора по e-commerce, продакт-менеджеры российских и международных производителей фармацевтических препаратов.



Регистрация на сайте: infor-media.ru

Подробности по тел. +7 495 995-80-04 и по e-mail e.pronenko@infor-media.ru

Оригинальная статья/Research article

Образование посторонних примесей в полимерных частицах, содержащих доцетаксел, в процессе хранения и под действием гамма-облучения

Ю. И. Полтавец^{1*}, С. В. Алешин¹, В. В. Заварзина¹, А. И. Муравьева¹, А. А. Соболева²,
И. А. Тубашева¹, С. Л. Кузнецов¹

1 – ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»), 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1
2 – МИРЭА – Российский технологический университет (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86

*Контактное лицо: Полтавец Юрий Игоревич. E-mail: poltavets_yi@nrcki.ru

Статья получена: 05.12.2019. Статья принята к печати: 10.02.2020

Резюме

Введение. Доцетаксел широко применяется в лечении онкологических заболеваний. Для вновь разрабатываемых препаратов, где доцетаксел включён в состав полимерных частиц, актуален вопрос применимости существующих требований к посторонним примесям. Технология получения нового препарата, включая стадию гамма-стерилизации, отличается от технологии существующих препаратов доцетаксела. В настоящем исследовании изучались полимерные частицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА), содержащие доцетаксел. Основное внимание было уделено ранее не проводившемуся изучению качественного и количественного состава посторонних примесей к доцетакселу, образование которых связано с длительным хранением и воздействием гамма-излучения и сравнению полученных данных с фармакопейными требованиями к применяемому в настоящее время инъекционным формам доцетаксела.

Цель. Изучение закономерностей образования посторонних примесей в полимерных формах доцетаксела, как интактных, так и подвергшихся гамма-стерилизации.

Материалы и методы. Объектами исследования были ранее полученные авторами полимерные формы доцетаксела в виде лиофилизатов. Качественный и количественный анализ образцов проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Изучены образцы полимерных форм доцетаксела по показателю «Посторонние примеси». Показано, что качественный и количественный состав посторонних примесей в образцах, подвергшихся гамма-стерилизации, отличается от состава примесей в интактных образцах с различными сроками хранения.

Заключение. Полимерные формы доцетаксела продемонстрировали стабильность в процессе хранения. Доказано влияние гамма-облучения (гамма-стерилизации) на состав посторонних примесей к доцетакселу. Гамма-стерилизация является перспективным направлением при разработке новых лекарственных средств, но в каждом случае необходима оптимизация условий её проведения.

Ключевые слова: доцетаксел, посторонние примеси, гамма-облучение, стерилизация, полимерные формы, лиофилизат.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Ю. И. Полтавец, В. В. Заварзина разработали способ получения экспериментальных образцов, выполнили планирование экспериментальной части и обработку полученных результатов. С. В. Алешин, А. И. Муравьева и А. А. Соболева разработали аналитические методики, выполнили пробоподготовку и анализ образцов. И. А. Тубашева и С. Л. Кузнецов получали экспериментальные образцы, проводили эксперимент по их длительному хранению. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Полтавец Ю. И., Алешин С. В., Заварзина В. В., Муравьева А. И., Соболева А. А., Тубашева И. А., Кузнецов С. Л. Образование посторонних примесей в полимерных частицах, содержащих доцетаксел, в процессе хранения и под действием гамма-облучения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 66–74.

Formation of Docetaxel-related Substances in the Polymer Particles During Storage and Gamma-treatment

Yury I. Poltavets^{1*}, Sergey V. Aleshin¹, Vasilisa V. Zavarzina¹, Anna I. Murav'eva¹,
Anastasia A. Soboleva², Irina A. Tubasheva¹, Sergey L. Kuznetsov¹

1 – Kurchatov Institute, 1, Academician Kurchatov sq., Moscow, 123182, Russia
2 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadskogo av., Moscow, 119571, Russia

*Corresponding author: Yury I. Poltavets. E-mail: poltavets_yi@nrcki.ru

Received: 05.12.2019. Accepted: 10.02.2020

Abstract

Introduction. Docetaxel is widely used for cancer treatment. Actual issue for newly developed polymer-based Docetaxel formulations is applicability of current quality requirements. The technology of polymeric forms, including gamma-sterilization, are differ from actual Docetaxel injections technology. In this study were used PLGA-based particles with Docetaxel. The main attention was directed to studying qualitative and quantitative content of related impurities in polymeric forms during long-term storage and gamma-sterilization in comparison with pharmacopoeial requirements for Docetaxel injections.

Aim. Studying of possible patterns of Docetaxel-related impurities formation between intact and gamma-irradiated batches.

Materials and methods. Objects of study – lyophilizates of Docetaxel polymeric forms was previously obtained by the authors. Qualitative and quantitative analysis was performed by high pressure liquid chromatography.

Results and discussion. Docetaxel-related impurities was determined and evaluated in the intact and gamma-treated batches. It was cleared, that related substances in the gamma-treated batches was different in comparison with non-treated but after vary storage periods.

Conclusion. Docetaxel-loaded polymeric drugs shown proper stability during long term storage. The influence of gamma-treatment to Docetaxel-related impurities content was found. Gamma sterilization can be promising method for novel drugs, but it needs individual study in the each case.

Keywords: Docetaxel, related substances, gamma-irradiation, sterilization, polymeric drugs, lyophilizate.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Yury I. Poltavets, Sergey V. Aleshin and Vasilisa V. Zavarzina developed method for obtaining experimental batches and processed of research results. Anna I. Murav'eva, Anastasia A. Soboleva performed sample preparation and analysis of samples. Irina A. Tubasheva, Sergey L. Kuznetsov obtained experimental batches and conducted an experiment on long-term storage. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

For citation: Poltavets Yu. I., Aleshin S. V., Zavarzina V. V., Murav'eva A. I., Soboleva A. A., Tubasheva I. A., Kuznetsov S. L. Formation of Docetaxel-related substances in the polymer particles during storage and gamma-treatment. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 66–74.

ВВЕДЕНИЕ

Биоразлагаемые полимерные частицы, содержащие активную фармацевтическую субстанцию, являются отдельным направлением в разработке лекарственных средств. Лекарственная форма – лиофилизат для приготовления суспензии. Нами были получены образцы полимерных частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА) и доцетаксела. Образцы показали высокую активность *in vitro* [1]. Технология получения полимерных форм отличается от применяемых препаратов доцетаксела. Помимо способа получения частиц нами была изучена возможность гамма-стерилизации готовой формы. Метод прост и удобен, но требует подбора оптимального режима для сохранения характеристик получаемых частиц [2–5]. Было установлено, что для полимерной формы доцетаксела влияние гамма-излучения сказывается как на размере частиц, так и на содержании в них доцетаксела. [6]. Зависимость содержания доцетаксела от условий стерилизации связана с его деградацией и накоплением посторонних примесей в ходе ее проведения. Пути деградации доцетаксела в различных условиях (температура, pH среды) были изучены и описаны в работах [7, 8]. Известны сравнительные исследования содержания посторонних примесей в выпускаемых препаратах доцетаксела [9]. В настоящей работе было впервые изучено образование посторонних примесей в полимерных формах доцетаксела в ходе их хранения и в процессе гамма-стерилизации. Проведённое исследование позволяет соотнести результаты, полученные для экспериментальных образцов полимерных частиц, содержащих доцетаксел, с предъявляемыми фармакопейными требованиями [10] к представленным на рынке инъекционным лекарственным формам доцетаксела, как оригинальным (Taxotere®™), так и воспроизведённым.

Цель работы: изучить закономерности образования посторонних примесей к доцетакселу в процессе получения полимерных форм препарата и его гамма-стерилизации.

Задачи исследования:

- выполнить определение посторонних примесей к доцетакселу в полимерных формах и оценить соот-

ветствие данному показателю, согласно фармакопейным требованиям [10, 13];

- выявить закономерности образования посторонних примесей в образцах, подвергнутых гамма-облучению, по сравнению с интактными образцами;
- сделать предварительное заключение о приемлемости метода гамма-стерилизации для разрабатываемых полимерных форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модифицированные конъюгатом фолиевой кислоты полимерные комплексы (частицы) для молекулярно-прицельной терапии, содержащие доцетаксел (ПКМППТ-Д), были получены методом простых эмульсий. Полимер (ПЛГА) и доцетаксел растворяли в дихлорметане, куда вносили раствор додециламида фолиевой кислоты в апротонном растворителе [11]. К полученной органической фазе добавляли водную фазу (раствор поливинилового спирта) и затем двукратно эмульгировали смесь с помощью ультразвука на льду.

Летучий растворитель удалялся при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 16 часов в ламинарном токе воздуха.

К полученной суспензии добавляли раствор натрия хлорида, замораживали в жидком азоте и подвергали лиофильной сушке. Лيوфилизат собирали в предварительно стерилизованные пластиковые контейнеры с герметичными крышками и хранили при 5 ± 3 °C. Образцы для длительного хранения и гамма-облучения, примерно по 100 мг лиофилизата, отбирали в стеклянные пенициллиновые флаконы нейтрального стекла, которые укупоривали резиновой пробкой под обкатку алюминиевым колпачком. Длительное хранение проводили при температуре 5 ± 3 °C и относительной влажности 55–65 % в защищённом от света месте. Более подробно см. работу [6].

Биологическая активность полученных образцов превышала активность субстанции доцетаксела в аналогичных дозах, эффективность адресного действия фолатного вектора также была подтверждена в опыте *in vitro* [1].

Определение примесей проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с детектированием в ультрафиолетовой области спектра (ВЭЖХ-УФ) или масс-спектрометрическим (МС) детектированием (ЖХМС).

Приготовление растворов

В качестве растворителя использовалась смесь ацетонитрила, воды и ледяной уксусной кислоты в соотношении 100:100:1 соответственно. Анализируемые образцы растворяли в ДМСО и затем разбавляли растворителем. Соотношение объёмов ДМСО и растворителя составляло 1:4.

Хроматографирование

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 (США), оснащённом градиентным насосом, автосамплером, диодно-матричным детектором и масс-селективным детектором с тройным квадруполем (Agilent 6410). Обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения Agilent ChemStation (УФ-детектирование) и Agilent MassHunter (МС-детектирование).

Хроматографическое разделение проводили на колонке Kromasil 100-C18 250 × 4,6 мм, при 30 °С. Скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. В качестве компонентов подвижной фазы использовались ацетонитрил и 0,1 М раствор формиата аммония. Применялся градиентный режим элюирования: содержание ацетонитрила в составе подвижной фазы от начала анализа до 9 минуты составляло 28 %, от 9 до 39 минуты осуществлялся рост до 72 %, от 39 до 40 минуты – снижение до 28 %, от 40 до 50 минуты – 28 %.

Объём вводимой пробы при использовании УФ-детектирования составлял 45 мкл, при использовании МС-детектирования – 6 мкл. УФ-детектирование осуществлялось при длине волны 230 нм, МС-детектирование осуществлялось в режиме сканирования при негативной ионизации в диапазоне масс от 250 до 1000.

Предел количественного определения доцетаксела для методики составляет 2 мкг/мл, предел обнаружения 1 мкг/л. Минимальная концентрация свежеприготовленного раствора доцетаксела тригидрата, при которой обнаруживаются все определяемые при помощи методики неидентифицированные примеси, составляет 200 мкг/мл, что соответствует содержанию доцетаксела в растворе частиц ПКМПТ-Д с концентрацией около 8 мг/мл. Концентрации исследованных растворов частиц ПКМПТ-Д составили не менее 8,75 мг/мл, предел обнаружения единичной неидентифицированной примеси составил 0,02 % относительно площади пика доцетаксела (пики площадью 2 и менее не учитывались при оценке содержания примесей методом ВЭЖХ-УФ); разрешение для пиков примесей составляло не менее 1.

В случаях, когда это было возможно, обнаруженные примеси соотносили с примесями, описанными в фармакопеях США [10] и ЕС [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены хроматограммы доцетаксела тригидрата и образцов ПКМПТ-Д после получения, и через 12 месяцев хранения. Количественное содержание нормируемых примесей [10] для исследованных образцов приведено в таблицах 1 и 2, представлены их структурные формулы. Неидентифицированная примесь с относительным временем удерживания 0,87 указана в таблицах 1 и 2 отдельно, так как отмечено её значительное накопление в процессе хранения. Масс-спектр данной примеси не отличался от масс-спектра доцетаксела, что характерно для изомеров. Основываясь на полученных результатах и литературных данных [8], было сделано предположение, что данная примесь представляет собой 2'-эпидоцетаксел.

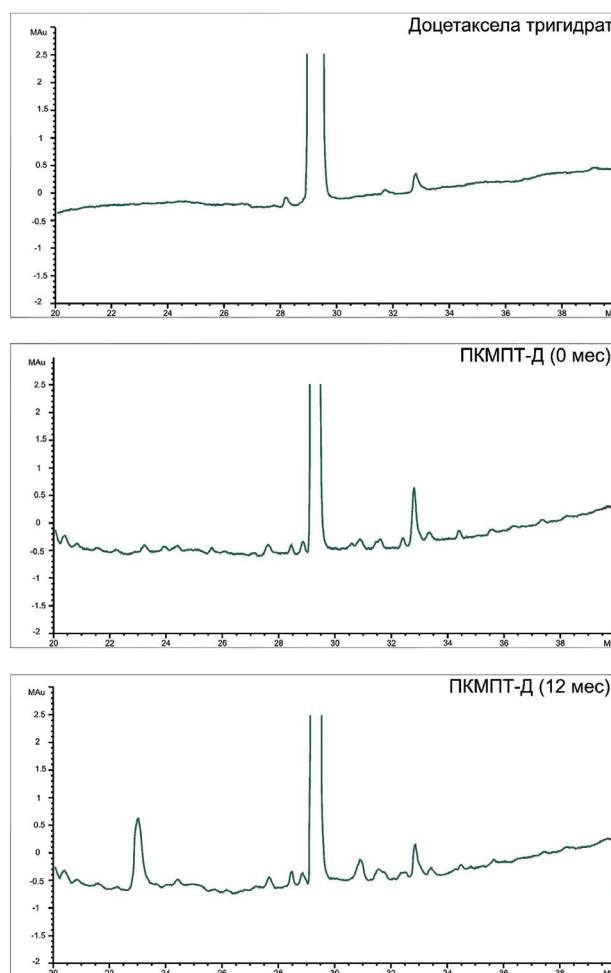


Рисунок 1. Хроматограмма субстанции доцетаксела тригидрата, ПКМПТ-Д на момент начала хранения и ПКМПТ-Д через 12 месяцев хранения

Figure 1. Chromatogram of Docetaxel trihydrate API, and Docetaxel polymeric forms before and after long-term storage (0 and 12 months)

Таблица 1. Содержание примесей в исходной субстанции доцетаксела тригидрата и полученном образце ПКМПТ-Д до и после хранения

Table 1. Comparative content of Docetaxel-related substances in the used Docetaxel trihydrate API and analyzed batch before and after storage

Наименование примеси/относительное время удерживания*	Содержание примеси относительно пика доцетаксела при длине волны 320 нм (ВЭЖХ-УФ), %			Нормированные значения для готовой формы (USP), % не более
	Доцетаксела тригидрат**	ПКМПТ-Д		
		0 мес	12 мес	
10-Дезацетил баккатин (EP E)/0,27				0,30
Неидентифицированная примесь (предположительно 2'-эпидоцетаксел)/0,87	Не нормируется		0,54	Не нормируется
2-Дебензоксил, 2-пентолоил доцетаксел (EP A)/0,97	<0,05	0,04***		—
Кротональдегидный аналог/1,05		0,11	0,05	1,3
6-Оксодоцетаксел (EP B)/1,08	0,05	0,09		1,5
4-Эпидоцетаксел (EP C)/1,13	0,14	0,37	0,11	1,0
4-Эпи-6-оксодоцетаксел (EP D)/1,18				0,5
Любая неидентифицированная примесь				0,2
Суммарное содержание примесей, %	<0,24	0,61	0,70	3,5

Примечания: *Тривиальное химическое наименование, используемое в USP, и обозначение примеси по EP (если есть).

**Субстанция доцетаксела тригидрата соответствует требованиям EP 8.0.

***Согласно требованиям USP не учитываются пики примесей, площадь которых менее 0,1 %.

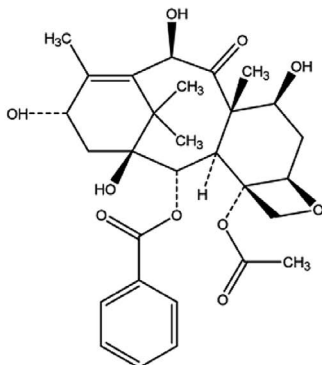
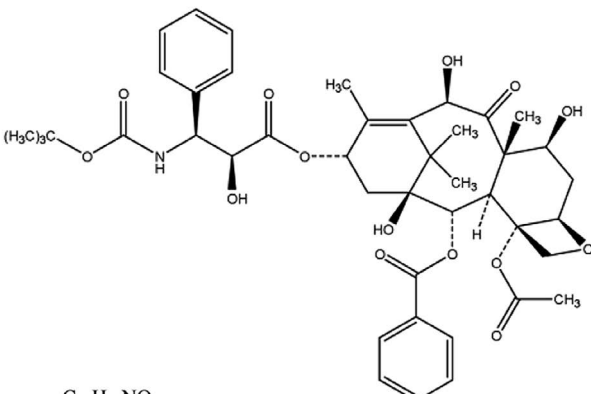
Notes: *Trivial chemical name used in USP and its EP label (if exists).

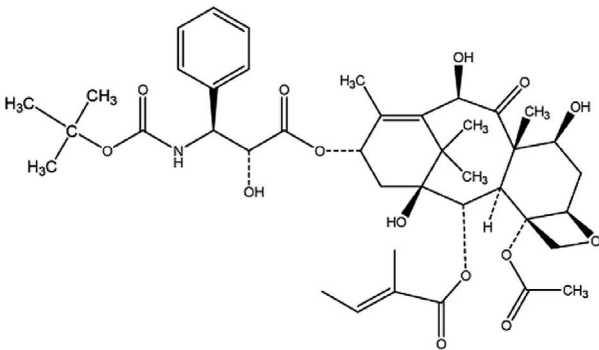
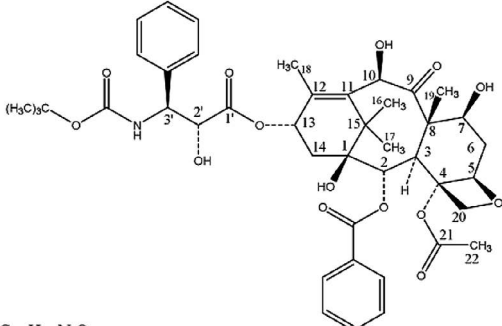
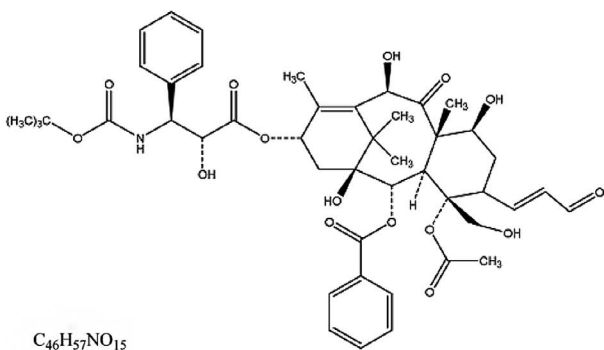
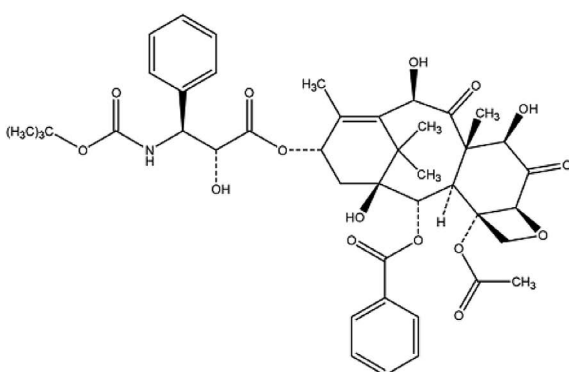
**Quality of Docetaxel trihydrate API meets EP 8.0.

***USP acceptance criteria: Disregard any peak less than 0.1 % and any peak with a relative retention time less than 0.2 and greater than 1.3.

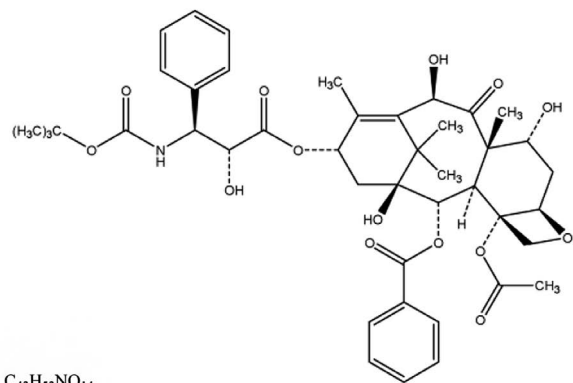
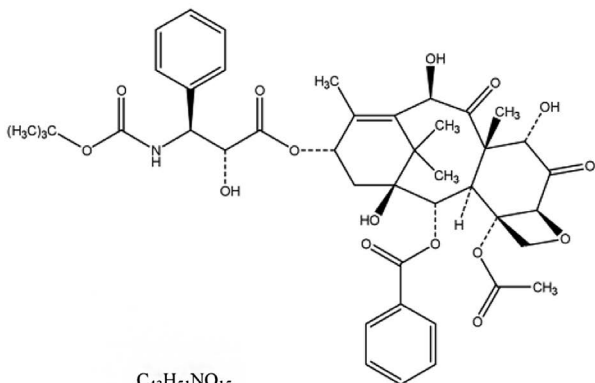
Таблица 2. Наименование, формула, молекулярная масса доцетаксела и примесей

Table 2. Name, structure and molecular mass of the docetaxel and its impurities

№	Наименование	Формула	М.м.
1	10-Дезацетил баккатин (EP E) (CAS № 32981-86-5)	 $C_{29}H_{36}O_{10}$	544,59
2	2'-Эпидоцетаксел (CAS н/д)	 $C_{43}H_{53}NO_{14}$	807,88

№	Наименование	Формула	М.м.
3	2-Дебензоксил 2-пентеноилдоцетаксел (EP A) (CAS № 1887057-05-7)	 $C_{41}H_{55}NO_{14}$	785,87
4	Доцетаксел (CAS № 162784-72-7)	 $C_{43}H_{53}NO_{14}$	807,88
5	Кротональдегидный аналог (CAS н/д)	 $C_{46}H_{57}NO_{15}$	805,86
6	6-Оксодоцетаксел (EP B) (CAS № 167074-97-7)		821,86

Окончание табл. 2

№	Наименование	Формула	М.м.
7	4-Эпидоцетаксел (EP C) (CAS № 114977-28-5)	 $C_{43}H_{53}NO_{14}$	807,88
8	4-Эпи-6-оксодоцетаксел (EP D) (CAS № 162784-72-7)	 $C_{43}H_{51}NO_{15}$	821,86

Появление посторонних примесей в образце, на момент начала хранения, связано с технологическим процессом получения ПКМППТ-Д. Отмечается эписмеризация доцетаксела, которая вносит наибольший вклад в содержание примесей; происходит деструкция доцетаксела с раскрытием гетероциклической структуры и образованием кротональдегидного аналога (таблицы 1 и 2). Окислительные процессы также наблюдаются в виде появления 6-оксодоцетаксела. В процессе хранения изменяется состав эписмеров, что может быть связано с процессами формирования квазикристаллических структур в полимерном носителе при хранении.

Предыдущие исследования показали, что в свежеполученном образце доцетаксел распределён равномерно в объёме полимерных частиц (эффективность включения составляла около 90 %), а сами частицы преимущественно аморфны по структуре по данным рентгеноструктурного анализа [6]. Использованный для получения образцов полимер ПЛГА с молярным соотношением остатков молочной и гликолевой кислот 50:50 обладает наименьшей кристаллическостью из известных сополимеров [14]. Однако присутствие в

составе полимерных частиц доцетаксела и малорастворимого векторного фрагмента может способствовать появлению кристаллической фазы, и сопровождаться эписмеризацией доцетаксела.

Низкое содержание посторонней примеси 6-оксодоцетаксела, вероятно, связано с включением доцетаксела в состав полимерной матрицы частиц. Таким образом, окислению может подвергнуться лишь не включённая в полимерные частицы часть доцетаксела (около 10 % от содержания в образце [6]). Судя по полученным данным, 6-оксодоцетаксел и его эписмер неустойчивы при хранении (см. таблицу 1). Предположительно, может происходить гидролиз сложного эфира с образованием 6-оксо-10-дезацетилбаккатина и трет-бутилоксикарбониламида-2-гидрокси-3,3-аминофенилпропионовой кислоты. Механизм последующего разложения 6-оксо-10-дезацетилбаккатина неясен, производное аминофенилпропановой кислоты в итоге разлагается до трет-бутанола и 2-гидрокси-3,3-аминофенилпропионовой кислоты [8]. Продукты разложения обладают минимальными временами удерживания и не детектируются в использованной хроматографической системе.

Образование примесей в процессе гамма-облучения

Исследование образцов, подвергшихся гамма-облучению, показало увеличение содержания посторонних примесей, представляющих собой продукты деградации доцетаксела. Такой результат обусловлен действием ионизирующего излучения [2–5]. Качественный состав посторонних примесей в ПКМПТ-Д после гамма-облучения отличался от свежеполученного образца и образца после хранения. Было выявлено отличие и от литературных данных по моделированию деградации доцетаксела в различных условиях [8].

В таблице 3 представлены сравнительные данные по содержанию примесей в облучённых образцах по сравнению с интактным образцом ПКМПТ-Д и образцом субстанции после термического воздействия (условное моделирование процессов деградации доцетаксела в течение длительного хранения). Для обнаруженных примесей приведены относительные (к доцетакселу) времена удерживания, где это было возможно – идентифицированы примеси. На рисунке 2 приведены хроматограммы образцов доцетаксела. На рисунке 3 представлено сравнительное распределение образцов по качественному и количественному содержанию посторонних примесей к доцетакселу.

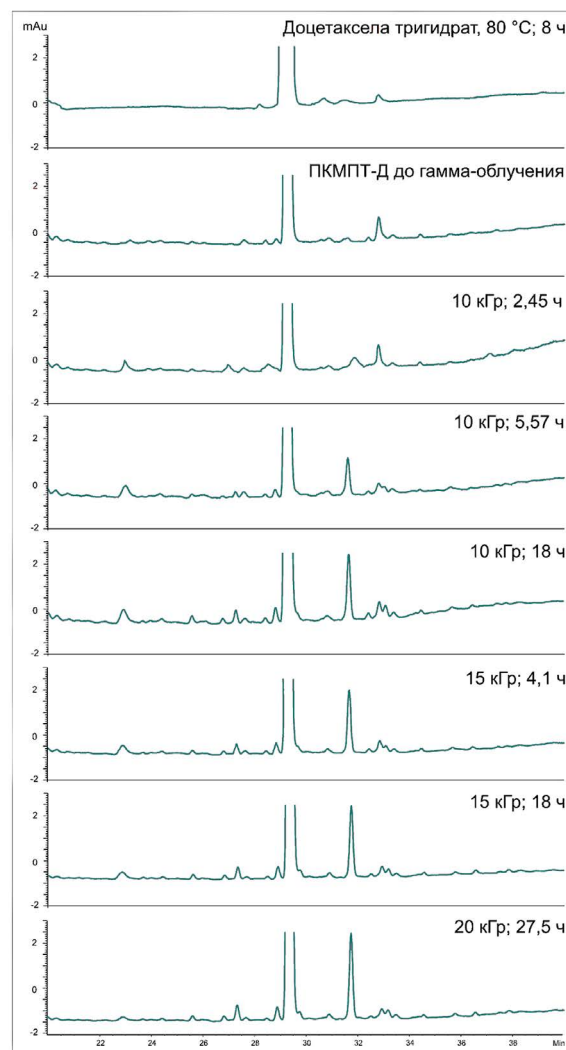


Рисунок 2. Хроматограмма образцов доцетаксела до и после гамма-облучения

Figure 2. Chromatogram of Docetaxel batches before and after gamma-treatment

Таблица 3. Сравнительные данные по содержанию примесей в облучённых и необлучённых образцах

Table 3. Comparative content of Docetaxel-related substances in the gamma-treated and non-treated batches

Относительное время удерживания	ПКМПТ-Д, %	Образцы после гамма-облучения, %*						Доцетаксела тригидрат субстанция (80 °C; 8 ч), %
		10 кГр; 2,45 ч	10 кГр; 5,57 ч	10 кГр; 18 ч	15 кГр; 4,1 ч	15 кГр; 18 ч	20 кГр; 27,5 ч	
0,57							0,10	
0,61							0,31	
0,65								0,16
0,78		0,1	0,35	0,25	0,25	0,24	0,11	
0,87**					0,06	0,07	0,09	
0,90								0,04
0,93		0,05	0,07	0,12	0,09	0,18	0,27	0,03
0,97 (EP A)	0,04							
0,98		0,07	0,11	0,13		0,18	0,23	0,08
1,05 (Кротональдегидный аналог)	0,11			0,07				
1,08 (EP B)	0,09	0,24	0,63	0,89	0,65	1,21	1,69	0,08
1,12 (EP C)	0,37	0,34	0,29	0,26	0,27	0,30	0,39	0,05
Суммарно примесей, %	0,61	0,80	1,45	1,72	1,32	2,18	3,19	0,44

Примечание: *Указана доза (кГр) и время экспозиции (ч), за которое доза была накоплена.

**Предположительно 2'-эпидоцетаксел.

Note: *The dose (kGy) and exposure time (h) for which the dose was accumulated are indicated.

**2'-Epidocetaxel (presumably).

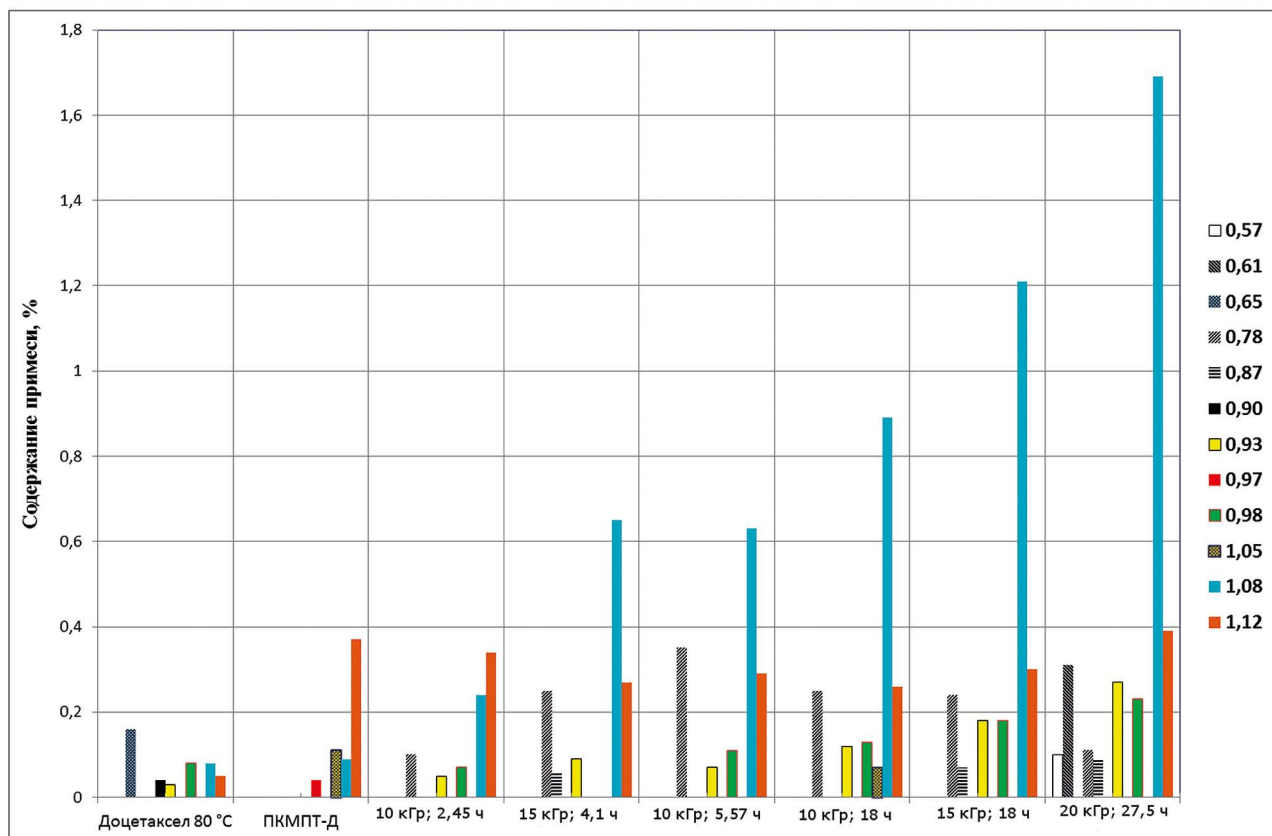


Рисунок 3. Распределение образцов по качественному и количественному содержанию посторонних примесей к доцетакселу

Примечание: Образцы ранжированы по нарастанию суммарного содержания посторонних примесей к доцетакселу. Окраска и штриховка столбцов соответствует относительному времени удерживания обнаруженной примеси

Figure 3. Distribution of batches by qualitative and quantitative Docetaxel-related impurities content

Note: Samples are ranked by the increase in the total content of Docetaxel-related impurities. Color and grid patterns of the columns corresponds to the relative retention time of each founded impurity

Суммарное содержание примесей в облучённых образцах оказалось выше, чем в интактных образцах (см. таблицу 1) и термообработанной субстанции доцетаксела. С ростом накопления дозы и длительности экспозиции, появляется значительное количество пиков неидентифицированных примесей с относительным временем удерживания 0,98 и меньше. Для известных примесей можно выделить тенденцию к увеличению содержания 4-эпидоцетаксела (EP C) и 2-эпи-6-осодоцетаксела с ростом накопления дозы облучения. Накопление (предположительно) 2'-эпидоцетаксела отмечается только для образцов, получивших дозу не менее 15 кГр.

Воздействие гамма-облучения на ПКМПТ-Д приводит как к образованию в них примесей, накопление которых возможно в процессе хранения, так и к появлению специфичных для гамма-облучения продуктов деградации доцетаксела. Таким образом, возможность применения гамма-стерилизации для исследованных объектов существует, но ограничена узким интервалом возможных условий стерилизации. Ранее было установлено, что оптимальным, с точки

зрения достижения стерильности, сохранения размера частиц и содержания доцетаксела является облучение с накопленной дозой 10 кГр, мощностью 0,5 Гр/с и экспозицией 5,57 ч [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных образцов показал, что полимерные композиции, содержащие доцетаксел, достаточно стабильны в условиях длительного хранения. По составу посторонних примесей, такие композиции отличаются от известных лекарственных форм доцетаксела, что, вероятно, связано с большой площадью поверхности полимерных частиц, на которой могут происходить процессы деградации доцетаксела. Применяемые в настоящее время лекарственные формы доцетаксела являются комплексными растворами, в которых процессы деградации протекают иначе. Образование 6-оксодоцетаксела обусловлено способом получения препарата; дальнейшее снижение его содержания в процессе хранения указывает на нестабильность данной примеси. Характерной посто-

ронней примесью, содержание которой нарастает в процессе хранения ПКМПТ-Д, является, предположительно, 2'-эпидоцетаксел.

Гамма-стерилизация – предпочтительный метод стерилизации полимерных лекарственных форм, ввиду неприменимости иных способов стерилизации. Возможность использования гамма-стерилизации требует изучения характера воздействия ионизирующего облучения на препарат. Представленные результаты демонстрируют, что характер накопления примесей в облучённых образцах имеет свои выраженные особенности. В частности, отмечается взаимосвязь между количественным содержанием посторонних примесей, накопленной дозой и временем экспозиции. При подборе режима стерилизации для полимерных форм необходимо стремиться как к снижению дозы, так и к сокращению времени экспозиции, поскольку процессы деградации доцетаксела зависят от нее. Необходимы выделение и идентификация образующихся при гамма-стерилизации примесей, также изучение динамики изменения их содержания в процессе последующего длительного хранения. Метод гамма-стерилизации прост и удобен. Он позволяет стерилизовать продукцию после ее упаковки, что является одним из его достоинств. Стерилизация снижает риск микробной контаминации препарата по сравнению с приготовлением в асептических условиях. При подборе оптимальных условий, гамма-стерилизация может быть применена для широкого спектра полимерных форм, разработка которых ведётся в настоящее время.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Poltavets Y. I., Zhirnik A. S., Zavarzina V. V., Semochkina Y. P., Shuvatova V. G., Krashenninnikova A. A., Aleshin S. V., Dronov D. O., Vorontsov E. A., Posypanova G. A., Balabanyan V. Y. *In vitro* anticancer activity of folate-modified docetaxel-loaded PLGA nanoparticles against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Nanotechnology*. 2019; 10: 2. DOI: 10.1186/s12645-019-0048-x.
2. Bushell J. A., Claybourn M., Williams H. E., Murphy D. M. An EPR and ENDOR study of γ - and β -radiation sterilization in poly (lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J. Control. Release*. 2005; 110(1): 49–57. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.09.009.
3. Friess W., Schlapp M. Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006; 63(2): 176–187. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.11.007.
4. Sintzel M.B., Merkli Al., Tabatabay C., Gurny R. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers: A Review. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1997; 23(9): 857–878. DOI: 10.3109/03639049709148693.
5. Maksimenko O., Pavlov E., Tushov E., Molin A., Stukalov Y., Prudskova T., Feldman V., Kreuter J., Gelperina S. Radiation sterilization of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2008; 356(1-2): 325–332.
6. Poltavets Y. I., Zavarzina V. V., Kuznetsov S. L., Krashenninnikova A. A., Dronov D. O., Gukasova N. V., Shuvatova V. G., Balabanyan V. Y. Development of docetaxel-loaded folate-modified poly(lactic-co-glycolic acid) particles. *J. Rep. Pharm. Sci.* 2019; 8: 253–261. DOI: 10.4103/jrptps.JRPTPS_64_19.
7. Vasu D. R., Moses B. J., Vyas K., Sai Ram P., Ramachandra P., Sekhar N. M., Mohan Reddy D. N., Srinivasa Rao N. Isolation and characterization of impurities in docetaxel. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 40(3): 614–622. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.10.037.
8. Kumar D., Tomar R.S., Deolia S.K., Mitra M., Mukherjee R., Burman A.C. Isolation and characterization of degradation in docetaxel drug substance and its formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 43(4): 1228–1235. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.10.015.
9. Reddy A. M., Banda N., Dagbu S. G., Rao D. V., Kocherlakota C. S., Krishnamurthy V. Evaluation of the Pharmaceutical Quality of Docetaxel Injection Using New Stability Indicating Chromatographic Methods for Assay and Impurities. *Sci. Pharm.* 2010; 78(2): 215–231. DOI: 10.3797/scipharm.0912-14.
10. United States Pharmacopeia USP 38–NF 33 <Docetaxel injection> P. 3180.
11. Sanzakov M. A., Ignatov D. V., Prozorovskiy V. N., Druzhilovskaia O. S., Medvedeva N. V., Ipatova O.M. Development of targeted drug delivery system: synthesis of conjugates of address fragment (RA-COOH) with ligand (R-NH₂). *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2014; 60(6), 713–716 (in Russ). DOI: 10.18097/pbmc20146006713.
12. European Pharmacopoeia 8.0 07/2012:2593 Docetaxel, anhydrous, P. 2090–2092.
13. European Pharmacopoeia 8.0 07/2012:2449 Docetaxel, trihydrate, P. 2092–2093.
14. Makadia H. K., Siegel S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011; 3(3): 1377–1397. DOI: 10.3390/polym3031377.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-75-81>
УДК 615.07; 535.434



Оригинальная статья/Research article

Определение скорости растворения активных фармацевтических субстанций методом лазерной дифракции света

Е. В. Успенская^{1*}, И. В. Казымова¹, Т. В. Плетенева¹, Т. Е. Елизарова², А. В. Сыроешкин¹

1 – ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
2 – ООО «Контрольно-аналитическая лаборатория Фарманализ» (ООО «КоАЛ Фарманализ»), 127282, Россия, Москва, ул. Чермянская, д. 2

*Контактное лицо: Успенская Елена Валерьевна. E-mail: uspenskaya75@mail.ru

Статья получена: 02.12.2019. Статья принята к печати: 19.02.2020

Резюме

Введение. Стратегия контроля качества предусматривает соответствие лекарственного средства требованиям методик нормативной документации (НД) и критических показателей качества, обуславливающих его эффективность. Особое внимание следует уделять свойствам исходной фармацевтической субстанции (липофильности $\log P$, площади топологической полярной поверхности TPSA, размеру частиц, полиморфизму), определяющим растворимость и скорость растворения активной фармацевтической субстанции (АФС) с точки зрения их влияния на биодоступность готового лекарственного препарата *in vivo* [1–3]. Поскольку оценка фармакопейной растворимости АФС сводится к визуальной процедуре и использованию приблизительных терминов, нами разработана оригинальная методика определения скорости растворения лекарственных субстанций с применением метода лазерной дифракции света. Разработка и дальнейшее внедрение новой аналитической методики сопровождаются валидационными испытаниями, позволяющими подтвердить ее пригодность для целевого назначения [4]. Предложенная методика лазерного определения скорости растворения в воде лекарственной субстанции группы фторхинолона апробирована; в валидационные исследования включены элементы: прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная/промежуточная), линейность, аналитическая область.

Цель. Разработка методики определения скорости растворения активных фармацевтических субстанций методом лазерной дифракции света с элементами валидации.

Материалы и методы. Определение скорости растворения моксифлоксацина гидрохлорида проводили в воде для лабораторного анализа степени чистоты 1 (сверхчистая вода), полученной на установке Milli-Q® Integral, качество которой соответствует ГОСТ Р 52501-2005. Для определения скорости растворения применяли официальный метод исследования – малоугловое рассеяние лазерного света (метод лазерной дифракции); приборное оборудование – лазерный измеритель дисперсности Malvern 3600 EC.

Результаты и обсуждение. Разработана дополнительная аналитическая методика определения скорости растворения АФС методом лазерной дифракции света. Проведены валидационные исследования по параметрам: прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная/промежуточная), линейность, аналитическая область. Прецизионность оценена по результатам 18 измерений, коэффициент вариации составил 8 %, относительная ошибка среднего 4 %. Определена линейность (коэффициент корреляции $R = 0,992$). Диапазон применения аналитической методики зависит от ее назначения, определяется при анализе линейности и составляет от $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл до $5 \cdot 10^{-2}$ г/мл.

Заключение. Предложенная методика может быть использована в качестве самостоятельного испытания свойств фармацевтических субстанций как на стадии их разработки и доклинических исследований, так и при проведении контроля качества в дополнении к существующему фармакопейному тесту оценки растворимости фармацевтических субстанций, выраженной в условных терминах.

Ключевые слова: скорость растворения, лазерная дифракция, кинетика гетерогенных процессов, фторхинолоны, валидационные исследования.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы научной статьи участвовали в планировании эксперимента, написании текста и обсуждении результатов.

Благодарность. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

Для цитирования: Успенская Е. В., Казымова И. В., Плетенева Т. В., Елизарова Т. Е., Сыроешкин А. В. Определение скорости растворения активных фармацевтических субстанций методом лазерной дифракции света. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 75–81.

Determination of Active Pharmaceutical Substances Dissolution Rate by Laser Light Diffraction Method

Elena V. Uspenskaya^{1*}, Iliha V. Kazymova¹, Tatyana V. Pleteneva¹, Tatyana E. Elizarova², Anton V. Syroeshkin¹

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

2 – LLC «Control and Analytical Laboratory Farmanaliz», 2, Chernynskaya str., Moscow, 127282, Russia

*Corresponding author: Elena V. Uspenskaya. E-mail: uspenskaya75@mail.ru

Received: 02.12.2019. Accepted: 19.02.2020

Abstract

Introduction. The strategy of quality control of drugs provides for compliance with the requirements of regulatory documentation methods and critical quality indicators that determine its effectiveness. Special attention should be paid to the properties of the initial pharmaceutical substance (lipophilicity $\log P$, area of the topological polar surface of TPSA, particle size, polymorphism), which determine the solubility and dissolution rate of the active pharmaceutical substance (APS) in terms of their impact on the bioavailability of the finished drug *in vivo* [1–3]. Since the assessment

© Успенская Е. В., Казымова И. В., Плетенева Т. В., Елизарова Т. Е., Сыроешкин А. В., 2020

© Uspenskaya E. V., Kazymova I. V., Pleteneva T. V., Elizarova T. E., Syroeshkin A. V., 2020

of pharmacopoeia solubility of APS is reduced to a visual procedure and the use of approximate terms, we have developed an original method for determining the dissolution rate of substances using the laws of chemical kinetics. Validation of the analytical method is carried out at introduction of the new method, and also at change of conditions of analysis of medicines carried out during the life cycle (product lifecycle) of a pharmaceutical product and its manufacturing process [4]. The proposed technique for laser determination of the dissolution rate in water of a medicinal substance of fluoroquinolone group has been tested; elements have been included in validation studies: repeatability, precision, linearity and range.

Aim. Development of the method for determining the dissolution rate of active pharmaceutical substances by laser light diffraction with validation elements.

Materials and methods. Determination of the dissolution rate of moxifloxacin hydrochloride was carried out in water for laboratory analysis of purity level 1 (ultra-pure water) obtained on the Milli-Q® Integral, the quality of which corresponds to ISO 3696:1987. To achieve this goal, a pharmacopoeia method of research was used – low-angle scattering of laser light (laser diffraction method); instrument equipment – laser dispersion meter Malvern 3600 EC.

Results and discussion. An additional analytical method for determination of API dissolution rate by laser light diffraction method was developed. Validation studies on parameters: precision (repeatability, intra-laboratory/intermediate), linearity, analytical region. Precision was estimated based on the results of 18 measurements, the coefficient of variation was 8 %, the relative error of average 4 %. Linearity was determined (correlation coefficient $R = 0.992$). The range of application of the analytical technique depends on its purpose, is determined in the linearity analysis and ranges from $5 \cdot 10^{-3}$ g/ml to $5 \cdot 10^{-2}$ g/ml.

Conclusion. The proposed methodology can be used as an independent test of the properties of pharmaceutical substances both at the stage of their development and preclinical studies, and in the process of quality control in addition to the existing pharmacopoeia test to assess the solubility of pharmaceutical substances, expressed in terms of conditional.

Keywords: dissolution rate, laser diffraction, kinetics of heterogeneous processes, fluoroquinolones, validation studies.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors of the article participated in the planning of the experiment, writing the text and discussing the results.

Acknowledgement. The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100».

For citation: Uspenskaya E. V., Kazymova I. V., Pleteneva T. V., Elizarova T. E., Syroeshkin A. V. Determination of active pharmaceutical substances dissolution rate by laser light diffraction method. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 75–81.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым компонентом обеспечения качества лекарственного средства является разработка спецификации, включающей аналитические методики и критерии приемлемости, являющейся частью общей стратегии управления качеством [5]. В понятие «управление качеством» входят: контроль качества исходной субстанции, валидация, исследование стабильности и межсерийный контроль. В свою очередь при контроле качества исходной активной фармацевтической субстанции (АФС) указывают свойства, значимые для клинической практики, такие как pK_a , растворимость, $\log P$, полиморфизм, степень кристалличности, изомерия, распределение частиц по размерам. Исследованиям перечисленных важнейших свойств АФС посвящены многочисленные научные исследования [6–8]. Помимо перечисленных факторов на фармакологическую активность влияют растворимость, проницаемость через липидный слой мембран, адсорбция, диффузия и др. Растворимость обуславливает распределение вещества и, следовательно, во многом определяет фармакокинетические свойства лекарственного препарата [9]. Известно, что сродство к воде уменьшается при введении функциональных групп и радикалов в структуру молекулы лекарственного вещества в последовательности: карбоксильная > гидроксильная > альдегидная > кетогруппа > аминная > иминная > амидная > имидная (гидрофильные группы) и алкильная > фенильная (гидрофобные радикалы) [10].

Согласно [11] характеристики растворимости подразделяются на качественные и количественные. Представленная в ГФ РФ XIV общая фармакопейная статья (ОФС) «Растворимость» приводит понятие растворимости в качестве «приблизительной» характеристики и выражается в условных терминах (таблица 1).

Таблица 1. Обозначения растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ [12]

Table 1. Solubility designations for pharmaceutical substances and excipients [12]

Термин	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	до 1 включительно
Легко растворим	от 1 до 10 включительно
Растворим	от 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	от 30 до 100 включительно
Мало растворим	от 100 до 1000 включительно
Очень мало растворим	от 1000 до 10 000 включительно
Практически нерастворим	более 10 000

Следовательно, валидация и введение в анализ методики количественной оценки (k , c^{-1}) растворения лекарственных субстанций представляет актуальную задачу современной фармацевтической химии.

Цель работы. Разработка методики определения скорости растворения активных фармацевтических субстанций методом лазерной дифракции света с элементами валидации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Определение интенсивности лазерного светорассеяния во времени проводили с использованием дифракционного анализатора размера частиц Mastersizer 3600 EC (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), тип диспергирования – жидкий, длина волны сканирующего излучения $\lambda = 632$ нм; с использованием емкостной ячейки $V = 3$ мл, снабженной механической мешалкой. Рассеянное частицами дисперсной фазы излучение фиксируется под разными углами с помощью высокочувствительного многоэлементного детектора – фотодиодной матрицы.

Объектом исследования выступила активная фармацевтическая субстанции антибактериального действия группы фторхинолона – моксифлоксацина гидрохлорид (рисунок 1) [13, 14], производства Xi'an Henrikang Biotech Co., Ltd. Китай, серия MXI0615003, срок годности до 04.2020.

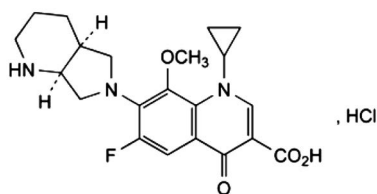


Рисунок 1. Химическая структура и систематическое название АФС

1-Циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолин-карбоновой кислоты гидрохлорид

Figure 1. Chemical structure and systematic name of active pharmaceutical ingredient

1-Cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-[(4aS,7aS)-octahydro-6H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-4-oxo-3-quinoline-carboxylic acid hydrochloride

Метод исследования

Для количественной характеристики растворения нами применен метод малоуглового рассеяния лазерного света, представленный в мировых фармакопеях в виде общей фармакопейной статьи «Light Diffraction

Measurements Of Particle Size» (ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции света») [15, 16]. Метод основан на регистрации индикатрисы рассеяния, возникающей при взаимодействии электромагнитного излучения с частицами дисперсной фазы. Результатом уменьшения дисперсности во времени является изменение углового распределения интенсивности рассеяния в зависимости от соотношения $\frac{\pi d}{\lambda}$, где λ – длина волны, d –

размер частиц [17]. Математически лазерное светозатемнение (*laser obscuration*, LO) может быть представлено выражением:

$$LO = 1 - I/I_0 \cdot 100 \% [18], \quad (1)$$

где I – интенсивность света, измеренная детектором, в то время как частица находится внутри измерительной ячейки; I_0 – интенсивность света, измеренная детектором без частицы в измерительной ячейке (рисунок 2).

Программное обеспечение

Для численного статистического и графического анализа полученных результатов применялся пакет программ фирмы OriginLab Corporation, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитическая методика определения скорости растворения

Навеску моксифлоксацина гидрохлорида для исследования растворения во времени подбирали, исходя из фармакопейной растворимости: для мало растворимых субстанций массой 1 г необходим объем растворителя от 100 до 1000 мл. Для измерений в емкостной кювете объемом 3 мл были взяты точные навески АФС $m = 0,0300$ г (или 1 г в 100 мл) для проведения параллельных измерений $n = 6$. Навеску порошка субстанции помещали в кювету с магнитной мешалкой измерительного блока прибора, добавляли точно отмеренный объем растворителя, что служило началом процесса растворения и измерения во времени регистрируемого показателя. Интервал измерения ла-

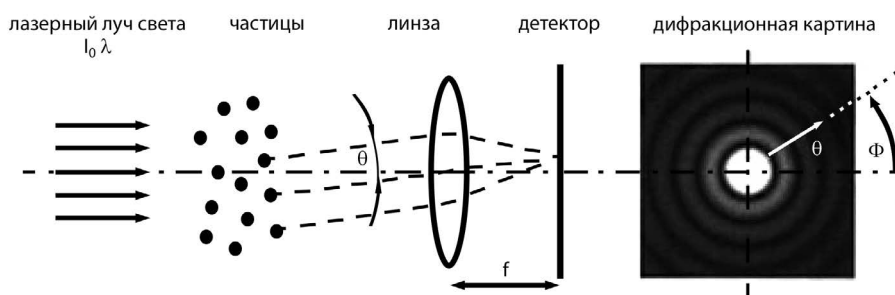


Рисунок 2. Оптическая схема малоуглового рассеяния лазерного света. Метод основан на стандарте ISO 13320:2009 [19]

Figure 2. Optical scheme of small-angle scattering of laser light. The method is based on the standard ISO 13320: 2009 [19]

зерного затемнения составил 10 секунд; измерение продолжали до прекращения изменения во времени регистрируемого показателя, который характеризует потерю интенсивности света при введении дисперсного образца в измерительную ячейку в результате рассеяния.

Предварительно производили измерение лазерного затемнения фона, в качестве которого служила среда растворения; $T = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Общее время одного измерения от внесения навески порошка в кювету до выхода измеряемого параметра на плато составило 1,5–2 минуты. В качестве растворителя для исследования скорости растворения использовали воду для лабораторного анализа степени чистоты 1 (сверхчистая вода), полученную на установке Milli-Q® Integral, качество которой соответствует ГОСТ Р 52501-2005 (удельное сопротивление $18,2\text{ МОм} \cdot \text{см}$, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, содержание органических примесных веществ $\text{TOC} \leq 5\text{ ppb}$).

Применяя закономерности кинетики первого порядка в описании гетерогенных процессов, нами проведены исследования количественной оценки скорости растворения АФС разных химических и фармакологических классов [20]. Если считать, что изменением концентрации одного из реагентов – растворителя в процессе растворения можно пренебречь, тогда общий порядок кинетического уравнения равен единице, а реакция протекающая в таких условиях – «псевдопервого» порядка:

$$V = -\frac{dC}{dt} = \kappa C. \quad (2)$$

Интегрируя выражение в пределах $C = C_0$ при $t = 0$, получаем:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C}. \quad (3)$$

$$C = C_0 e^{-\kappa t}. \quad (4)$$

Уравнение (4) доказывает экспоненциальное уменьшение во времени концентрации одного из реагентов, а, применительно к методике, основанной на методе лазерной дифракции света – уменьшение лазерного затемнения, зависящего от дисперсности среды.

Прологарифмировав обе части, линейризуем уравнение (4) и используем его для определения растворения АФС, представив результаты экспоненциальных кривых в координатах:

$$y = \ln 1 - I/I_0, x = t.$$

Для определения скорости растворения нами рассчитаны значения констант скорости по коэффициенту b уравнения прямой $y = a + bx$, как тангенс угла наклона к оси абсцисс:

$$k = -\text{tg } \alpha; \text{tg } \alpha = -\frac{d(\text{laser obscuration})}{dt}. \quad (5)$$

Элементы валидации в рамках разработки аналитической методики

Валидационные исследования аналитической методики определения скорости растворения АФС методом лазерной дифракции проведены, основываясь на требованиях ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [21], а также руководства FDA [4] по следующим параметрам: повторяемость (сходимость), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, линейность, аналитическая область.

Повторяемость (прецизионность внутри методики)

Повторяемость методики оценена в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним методом, в одной лаборатории, одним лаборантом-исследователем, с использованием одного лазерного измерителя дисперсности, в пределах короткого промежутка времени.

На рисунке 3 представлена кинетическая кривая изменения во времени величины лазерного затемнения при растворении в воде моксифлоксацина гидрохлорида.

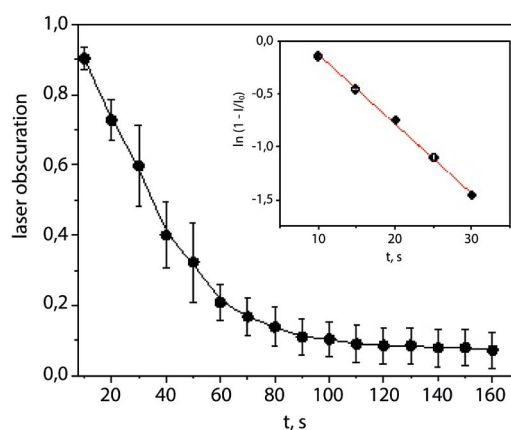


Рисунок 3. Зависимость величины лазерного затемнения во времени при растворении в воде моксифлоксацина гидрохлорида ($n = 6$, $P = 0,95$). На вставке – в полулогарифмических координатах

Figure 3. The dependence of the laser obscuration time values while dissolving the drug substance of moxifloxacin hydrochloride in water by laser diffraction method ($n = 6$, $P = 0,95$). In linear and semi-logarithmic coordinates (right inset)

Повторяемость выражена величиной дисперсии, стандартного отклонения, коэффициента вариации и доверительным интервалом (таблица 2).

Результаты статистической обработки свидетельствуют о достоверности полученных результатов при доверительной вероятности 95 %: рассчитанное значение коэффициента вариации (RSD) меньше 10 %, следовательно, степень рассеивания результатов измерений незначительная [21].

На основании оценки повторяемости аналитической методики проведены исследования внутрилабораторной прецизионности.

Таблица 2. Оценка повторяемости (сходимости) аналитической методики (n = 6; P = 0,95)

Table 2. The assessment of repeatability (convergence) of a new analytical technique (n = 6; P = 0,95)

k, c^{-1}	$\bar{k}, c^{-1}$	SD	S^2	RSD, %	$(\bar{k} \pm \Delta k), c^{-1}$ $t_{p,f} = 2,57$ при $P = 0,95; n = 6;$ $f = 5$
0,055; 0,061; 0,061; 0,057; 0,058; 0,053	0,058	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$9,6 \cdot 10^{-6}$	5,3	$0,058 \pm 0,003$

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Прецизионность, как выражение близости результатов между сериями измерений была оценена при проведении испытаний внутри лаборатории в разные дни на идентичных образцах одной серии моксифлоксацина гидрохлорида (таблица 3).

Таблица 3. Оценка внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности аналитической методики (n = 18, P = 0,95)

Table 3. The assessment of a new analytical technique's precision (n = 18, P = 0,95)

k, c^{-1}	$\bar{k}, c^{-1}$	SD	S^2	RSD, %	$(\bar{k} \pm \Delta k), c^{-1}$ $t_{p,f} = 2,57$ при $P = 0,95;$ $n = 18; f = 17$	$\bar{\epsilon}, \%$
0,055; 0,061; 0,061; 0,057; 0,058; 0,053; 0,055; 0,059; 0,065; 0,052; 0,058; 0,053; 0,055; 0,060; 0,051; 0,057; 0,050; 0,053	0,057	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	8,3	$0,057 \pm 0,002$	4,1

Коэффициент вариации составил 8 %, относительная ошибка среднего – 4 %, что доказывает пригодность разработанной аналитической методики определения скорости растворения фармацевтической субстанции моксифлоксацина гидрохлорида, основанной на малоголовом рассеянии лазерного света [4, 21].

Линейность и аналитическая область

Линейность, как прямую зависимость регистрируемого сигнала от концентрации в пределах аналитической области подтверждали приготовлением отдельных (модельных) навесок моксифлоксацина гидрохлорида с использованием разработанной аналитической методики. Линейность оценивали визуально по графику зависимости величины лазерного затемнения – C, г/мл (рисунок 4). Для установления линейности использовали 6 концентрации, исхо-

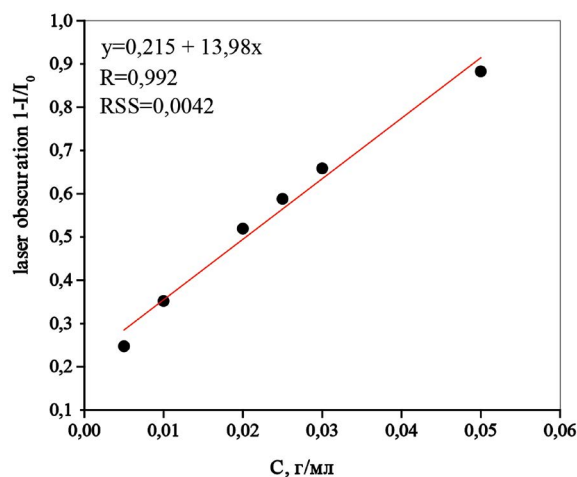


Рисунок 4. Результаты определения зависимости между величиной лазерного затемнения (*laser obscuration*) и концентрации раствора моксифлоксацина гидрохлорида

Figure 4. The results of determining the dependence between the values of *laser obscuration* on the concentration of moxifloxacin hydrochloride solution

дя из растворимости в воде умеренно растворимой фармацевтической субстанции моксифлоксацина гидрохлорида (0,01 г/мл).

Диапазон применения аналитической методики зависит от ее назначения, определяется при анализе линейности и составляет от $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл до $5 \cdot 10^{-2}$ г/мл (см. рисунок 4). Для подтверждения линейности представлены: коэффициент корреляции ($R > 0,99$), свободный член регрессии ($a = 0,215$), тангенс угла наклона линии регрессии ($b = 13,98$) и остаточная сумма квадратов отклонений ($RSS = 0,0042$) (см. рисунок 4). В пределах диапазона применения методика обеспечивает требуемую линейность и прецизионность.

В условиях отсутствия в НД истинного/условно истинного (действительного) значения определяемой величины – константы скорости растворения (k, c^{-1}), активных фармацевтических субстанций, валидационный параметр «правильность», выражающий степень близости результата измерений к истинному, не был оценен. Это связано в том числе с тем, что количественная оценка скорости растворения АФС не входит в настоящий момент в число наиболее распространенных видов аналитических методик (испытание на подлинность, количественное и полуквантитативное определение содержания примесных веществ, количественное определение АФИ) и подлежит отнесению к дополнительным аналитическим методикам. Однако, учитывая тот факт, что стандартизованная процедура валидации аналитической методики включает в себя определение всех характеристик, включенных в [21], нами запланированы валидационные исследования с применением эталонного спектрофотометрического метода для определения концентрации раствора АФС во времени при растворении с последующим расчетом констант скорости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана дополнительная аналитическая методика определения скорости растворения АФС методом лазерной дифракции света. Проведены валидационные исследования по параметрам: прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная/промежуточная), линейность, аналитическая область. Прецизионность оценена по результатам 18 измерений, коэффициент вариации составил 8 %, относительная ошибка среднего 4 %. Определена линейность (коэффициент корреляции $R = 0,992$). Диапазон применения аналитической методики зависит от ее назначения, определяется при анализе линейности и составляет от $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл до $5 \cdot 10^{-2}$ г/мл.

Методика может быть использована в качестве самостоятельного испытания свойств фармацевтических субстанций как на стадии их разработки и доклинических исследований, так и при проведении контроля качества в дополнении к существующему фармакопейному тесту оценки растворимости фармацевтических субстанций, выраженной в условных терминах [22, 23].

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang J., Liao Y., Xia J., Wang Z., Mo X., Feng J., He Y., Chen X., Li Y., Lu F. Mechanical micronization of lipoaspirates for the treatment of hypertrophic scars. A Brief Review of the FDA Dissolution Methods Database. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10: 2–10.
2. Syroeshkin A. V., Uspenskaya E. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A., Maksimova T. V., Koldina A. M., Makarova M. P., Levitskaya O. V., Zlatkiy I. A. Mechanochemical activation of pharmaceutical substances as a factor for modification of their physical, chemical and biological properties. *International Journal of Applied Pharmaceutics.* 2019; 11: 118–123.
3. Timur S. S., Yöyen-Ermiş D., Esendağlı G., Yonat S., Horzum U., Esendağlı G., Gürsoy R. N. Efficacy of a novel LyP-1-containing self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for active targeting to breast cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 136: 138–146.
4. Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. USA. 2011. Available at: <https://www.fda.gov/media/71021/download>.
5. Резвых Ю. А., Ковальская Г. Н. Современные подходы к совершенствованию системы обеспечения и контроля качества лекарственных средств на региональном уровне. *Сибирский медицинский журнал.* 2013; 6: 104–106.
6. Shahram E., Abolghasem J., Hadi V., Ali S. Are Crystallinity Parameters Critical for Drug Solubility Prediction. *Journal of Solution Chemistry.* 2015; 44: 2297–2315.
7. Гильдеева Г. Н. Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и Актуальные методы анализа. *Качественная клиническая практика.* 2017; 1: 56–60.
8. Аксенова В. В., Канунникова О. М., Карбань О. В., Сулов А. А., Ладьянов В. И., Тукмачева К. А., Чучкова Н. Н., Сметанина М. В. Влияние механоактивации на состав, структуру и физико-химические свойства креатина и креатинина. *Химическая физика и мезоскопия.* 2019; 21(1): 103–114.
9. Savjani K. T., Gajjar A. K., Savjani J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *International Scholarly Research, Network ISRN Pharmaceutics.* 2012.
10. Солдатов А. И. Структура и свойства поверхности углеродных материалов. *Вестник ЧелГУ.* 2001; 1: 155–163.
11. Christel A. S., Bergström, Per Larsson, Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development

setting. *International Journal of Pharmaceutics.* 2018; 540(1–2): 185–193.

12. ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
13. Комаров Т. Н., Медведев Ю. В., Шохин И. Е., Болдина Ю. Е., Львова А. А., Мельников Е. С., Фишер Е. Н., Иванов Р. В., Максвитис Р. И. Разработка и валидация биоаналитической методики определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016; 3: 174–179.
14. McGee E. U., Samuel E., Boronea B., Dillard N., Milby M. N., Lewis S. J. Quinolone Allergy. *Pharmacy.* 2019; 7: 97.
15. The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 35–NF 31. *The United States Pharmacopeial Convention. Inc.: Rockville, MD.* 2013.
16. ОФС.1.2.1.0008.15 «Определение распределения частиц по размерам методом лазерной дифракции света». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2018. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/555/index.html#zoom=z
17. Zhaolin L., Xiaojuan H., Yao L. Particle Morphology Analysis of Biomass Material Based on Improved Image Processing Method. *Int J Anal Chem.* 2017; 1–9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5840690>.
18. Henry N. C. Diffraction before destruction. *Biol Sci.* 2014; 17: 1–13.
19. ISO 13320:2009 Particle Size Analysis–Laser Diffraction Methods. Part 1. General Principles. 2009.
20. Анфимова Е. В., Успенская Е. В., Плетенева Т. В., Сыроешкин А. В. Исследование кинетики растворимости лекарственных субстанций методом лазерной дифракции в водных растворах с различным изотопным составом по водороду. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017; 1: 150–155.
21. ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2018. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=z
22. Uspenskaya E. V., Anfimova E. V., Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V. Kinetics of Pharmaceutical Substance Solubility in Water with Different Hydrogen Isotopes Content. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2018; 80: 318–324.
23. Успенская Е. В., Кешишян А. А., Плетенева Т. В., Сыроешкин А. В. Разработка и валидация методики кинетической оценки растворения лекарственной субстанции топирамат методом лазерной дифракции света. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018; 2(23): 72–76.

REFERENCES

1. Wang J., Liao Y., Xia J., Wang Z., Mo X., Feng J., He Y., Chen X., Li Y., Lu F. Mechanical micronization of lipoaspirates for the treatment of hypertrophic scars. A Brief Review of the FDA Dissolution Methods Database. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10: 2–10.
2. Syroeshkin A. V., Uspenskaya E. V., Pleteneva T. V., Morozova M. A., Maksimova T. V., Koldina A. M., Makarova M. P., Levitskaya O. V., Zlatkiy I. A. Mechanochemical activation of pharmaceutical substances as a factor for modification of their physical, chemical and biological properties. *International Journal of Applied Pharmaceutics.* 2019; 11: 118–123.
3. Timur S. S., Yöyen-Ermiş D., Esendağlı G., Yonat S., Horzum U., Esendağlı G., Gürsoy R. N. Efficacy of a novel LyP-1-containing self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for active targeting to breast cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019; 136: 138–146.
4. Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. USA. 2011. Available at: <https://www.fda.gov/media/71021/download>.
5. Rezvyh Ju. A., Koval'skaja G. N. The modern approaches to improving the regional system of assurance and quality control of medicines. *Siberian Medical Journal.* 2013; 6: 104–106. (in Russ.).

6. Shahram E., Abolghasem J., Hadi V., Ali S. Are Crystallinity Parameters Critical for Drug Solubility Prediction. *Journal of Solution Chemistry*. 2015; 44: 2297–2315.
7. Gildeeva G. N. Polymorphism: the influence on the quality of drugs and actual methods of analysis. *Good Clinical Practice*. 2017; 1: 56–60 (In Russ.).
8. Aksenova V. V., Kanunnikova O. M., Karban' O. V., Suslov A. A., Lad'janov V. I., Tukmacheva K. A., Chuchkova N. N., Smetanina M. V. Effect of mechanoactivation on composition, structure and physico-chemical properties of creatinine and creatine. *Chemical Physics and Mesoscopy*. 2019; 21(1): 103–114. (In Russ.).
9. Savjani K. T., Gajjar A. K., Savjani J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *International Scholarly Research, Network ISRN Pharmaceutics*. 2012.
10. Soldatov A. I. The structure and surface properties of carbon materials. *Bulletin of ChelSU*. 2001; 1: 155–163. (In Russ.).
11. Christel A. S. Bergström, Per Larsson, Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018; 540(1–2): 185–193.
12. OFS.1.2.1.0005.15 «Solubility» State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. – M.: Ministry of Health of the Russian Federation. 2018. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (In Russ.).
13. Komarov T. N., Medvedev Y. V., Shohin I. E., Boldina Y. E., Lvova A. A., Melnikov E. S., Fisher E. N., Ivanov R. V., Maksvitis R. J. Development and validation of moxifloxacin determination in human plasma by HPLC-UV method. *Drug development & registration*. 2016; 3: 174–179. (In Russ.).
14. McGee E. U., Samuel E., Boronea B., Dillard N., Milby M. N., Lewis S. J. Quinolone Allergy. *Pharmacy*. 2019; 7: 97.
15. The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 35–NF 31. The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD (2013)
16. OFS.1.2.1.0008.15 «Determination of particle size distribution by laser light diffraction». State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. – M.: Ministry of Health of the Russian Federation. 2018. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/555/index.html#zoom=z (In Russ.).
17. Zhaolin L., Xiaojuan H., Yao L. Particle Morphology Analysis of Biomass Material Based on Improved Image Processing Method. *Int J Anal Chem*. 2017: 1–9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/5840690>.
18. Henry N. C. Diffraction before destruction. *B Biol Sci*. 2014; 17: 1–13.
19. ISO 13320:2009 Particle Size Analysis–Laser Diffraction Methods. Part 1. General Principles. 2009.
20. Anfimova E. V., Uspenskaya E. V., Pleteneva T. V., Syroeshkin A. V. Solubility kinetics of drugs studied by LALLS method in water solutions with various hydrogen isotope content. *Drug development & registration*. 2017; 1: 150–15 (In Russ.).
21. OFS.1.1.0012.15 «Validation of analytical methods». State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. – M.: Ministry of Health of the Russian Federation. 2018. Available at: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/276/index.html#zoom=z (In Russ.).
22. Uspenskaya E. V., Anfimova E. V., Syroeshkin A. V., Pleteneva T. V. Kinetics of Pharmaceutical Substance Solubility in Water with Different Hydrogen Isotopes Content. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 80: 318–324.
23. Uspenskaya E.V., Keshishian A.A., Nikiforova M.V., Pletneva T.V., Syroeshkin A.V. Development and validation of the method of kinetic evaluation of medical substance topiramate dissolution by laser diffraction of light method. *Drug development & registration*. 2018; 2(23): 72–76. (In Russ.).

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ЕАЭС» РЕГЛЕК – ЕАЭС 2020

20–22 апреля
2020
Москва

гостиница
«Холидей Инн Москва
Сокольники»

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

20 апреля

Пленарное заседание

Секционные заседания

- Особенности организации проведения регуляторных процедур по правилам ЕАЭС в странах Союза. Организация информационного обмена
- Очистка промышленных линий по производству ЛС и пределы воздействия на здоровье
- Экспертиза материалов регистрационного досье в части оценки качества по процедурам ЕАЭС
- Особая продукция — особая регистрация
- Инспектирование в ЕАЭС: кого, когда, зачем и как

21 апреля

Пленарная дискуссия

- Корабль Союз — полет нормальный!?

Секционные заседания

- Место инновационных (гибридных) ЛП в системе регистрации ЕАЭС
- Экспертные требования к оценке соотношения ожидаемой пользы к возможным рискам применения препаратов: критический взгляд на анализируемые досье
- Надлежащая регуляторная практика ЕАЭС
- Формирование и использование информации о лекарственных препаратах: что нужно знать фармпроизводителю

Круглый стол

- Актуальные вопросы экспертизы и регистрации лекарственных средств

22 апреля

Пленарная дискуссия

- Выпуск в гражданский оборот ЛП: система заработала, есть ли проблемы

Секционные заседания

- Актуальное состояние применения правил и требований ЕАЭС при подаче электронного общего технического документа
- Различные подходы к маркировке ЛП на этапе технологического процесса
- Фармакопейная сессия
- Трансфер и валидация
- В центре проблемы: модуль № 3 регистрационного досье и приведение в соответствие с правилами Союза

Обращаем Ваше внимание,
что Оргкомитет конференции
оставляет за собой право вносить
изменения в программу
и состав докладчиков



PerЛек – ЕАЭС
2020

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru
и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-83-91>
УДК 615.281.8



Обзорная статья/Review article

Специфическая терапия гриппа: современное состояние и перспективы (обзор)

А. И. Одноров^{1*}, Т. В. Гребенникова^{1,2}, Т. В. Плетенева¹

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
2 – ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

*Контактное лицо: Одноров Артём Игоревич. E-mail: mister.odn2010@yandex.ru

Статья получена: 26.11.2019. Статья принята к печати: 24.01.2020

Резюме

Введение. Респираторные инфекции являются одними из лидеров по заболеваемости и смертности по всему миру. Наиболее тяжелые случаи заболеваний чаще всего вызваны вирусом гриппа. В данный момент существует множество способов специфической профилактики и терапии инфекции гриппа, однако их эффективность далека от идеала. Это связано с высокой изменчивостью вируса гриппа и последующим возникновением резистентности к используемым препаратам. В связи с этим совершенствование и разработка противовирусных препаратов является актуальной задачей.

Текст. Вирус гриппа – РНК-содержащий вирус, который является причиной массовых эпидемий и пандемий. Специфическая профилактика гриппа включает в себя вакцинирование. Однако антигенная изменчивость вируса способствует снижению эффективности вакцины, что требует постоянной затратной разработки её более совершенных модификаций. Специфическая терапия инфекции гриппа включает несколько классов лекарственных препаратов, среди которых ингибиторы нейраминидазы (NA) – осельтамивир, занамивир и ингибиторы М2-белка – амантадин, римантадин. В свое время эти препараты обладали достаточной эффективностью. Но сформировавшаяся устойчивость вирусов гриппа к данным препаратам требует создания новых либо модификации существующих противовирусных средств. Среди новых отечественных разработок противовирусных препаратов следует упомянуть гистидил-1-адамантаилэтиламин, который является модификацией молекулы римантадина и на этапе доклинических исследований показал достаточную противовирусную активность. Представитель другого класса препаратов – арбидол (умифеновир), ингибитор гемагглютинина (HA) вируса гриппа. По данным исследований препарат имеет высокие профили эффективности и безопасности, однако рекомендация Всемирной организации здравоохранения – продолжить клинические испытания. В настоящее время проводятся клинические исследования препаратов новых классов – балоксавира марбоксила и фавипиравира. Балоксавира марбоксил – пролекарство, которое *in vivo* превращается в балоксавир – ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы. Фавипиравир – ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы. Исследования *in vitro* на культуре клеток и *in vivo* на лабораторных животных показали более высокую эффективность этих препаратов, чем у вышеупомянутых при минимальных значениях токсичности.

Заключение. Стремительное эволюционирование вируса гриппа приводит к постепенному снижению эффективности современных противовирусных препаратов. Новые соединения, нацеленные на важные для воспроизводства вируса мишени, находятся на стадиях клинических исследований. Будущее борьбы с гриппом зависит от итога этих испытаний, по результатам которых соединения могут стать эффективными препаратами для профилактики и лечения гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, противовирусная активность, ингибиторы нейраминидазы, адамантаны, балоксавир, производные римантадина.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Благодарности. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

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

Для цитирования: Одноров А. И., Гребенникова Т. В., Плетенева Т. В. Специфическая терапия гриппа: современное состояние и перспективы специфическая терапия гриппа: современное состояние и перспективы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 83–91.

Specific Influenza Therapy: Current State and Prospects (Review)

Artem I. Odnovorov^{1*}, Tat'yana V. Grebennikova^{1,2}, Tat'yana V. Pleteneva¹

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
2 – N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, 18, Gamalei str., Moscow. 123098, Russia

*Corresponding author: Artem I. Odnovorov. E-mail: mister.odn2010@yandex.ru

Received: 26.11.2019. Accepted: 24.01.2020

Abstract

Introduction. Respiratory infections are among the leaders in morbidity and mortality worldwide. The most severe cases of the disease are most often caused by the flu virus. Currently, there are many ways of specific prevention and treatment of influenza infection, but their effectiveness is far from ideal. This is due to the high variability of the influenza virus and the subsequent occurrence of resistance to the drugs used. In this regard, the improvement and development of antiviral drugs is an urgent task.

Text. Influenza virus is an RNA-containing virus that causes massive epidemics and pandemics. Specific influenza prophylaxis includes vaccination. However, antigenic variability of the virus reduces the effectiveness of the vaccine, which requires constant costly development of its more advanced modifications. Specific treatment for influenza infection includes several classes of drugs, such as neuraminidase (NA) inhibitors oseltamivir, zanamivir and M2 protein inhibitors amantadine, rimantadine. At one time, these drugs were quite effective. But the formed resistance of influenza viruses to these drugs requires the creation of new or modifications of existing antiviral agents. Among the new domestic developments of antiviral drugs, histidyl-1-adamantainethylamine, which is a modification of the rimantadine molecule, has shown sufficient antiviral activity at the stage of preclinical studies. A representative of another class of drugs is arbidol (umifenovir), an inhibitor of hemagglutinin (HA) of the influenza virus. According to studies,

© Одноров А. И., Гребенникова Т. В., Плетенева Т. В., 2020

© Odnovorov A. I., Grebennikova T. V., Pleteneva T. V., 2020

the drug has high profiles of efficacy and safety, but the recommendation of the World Health Organization is to continue clinical trials. Currently, clinical studies of new classes of drugs are underway – baloxavir marboxil and favipiravir. Baloxavir marboxil is a prodrug that is converted *in vivo* to baloxavir, an inhibitor of cap-dependent endonuclease. Favipiravir is an inhibitor of RNA-dependent RNA polymerase. *In vitro* studies in cell culture and *in vivo* in laboratory animals have shown higher efficacy of these drugs than the above with minimal toxicity.

Conclusion. The rapid evolution of the influenza virus leads to a gradual decrease in the effectiveness of modern antiviral drugs. New compounds targeting targets important for virus reproduction are in clinical trials. The future of the fight against influenza depends on the outcome of these tests, according to which the compounds can become effective drugs for the prevention and treatment of influenza.

Keywords: influenza virus, antiviral activity, neuraminidase inhibitors, adamantane, baloxavir, rimantadine derivatives.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Acknowledgements. Publication prepared with the support of the PFUR «5-100» Program.

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

For citation: Odnovorov A. I., Grebennikova T. V., Pleteneva T. V. Specific influenza therapy: current state and prospects. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 83–91.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп относится к группе острых респираторных инфекций (ОРВИ), которые являются самыми распространенными заболеваниями дыхательных путей. В основном прогноз гриппа благоприятный и инфекция проходит самостоятельно. Однако тяжелые формы гриппа могут приводить к серьезным осложнениям вплоть до летального исхода. Ежегодно, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на 2005 г., по всему миру регистрируется от 3 до 5 млн тяжелых случаев заболевания и приблизительно 250–500 тыс. смертельных исходов, а по состоянию на 2018 г. смертность составляла от 290 до 650 тыс. случаев в год [1]. При этом наиболее высокие показатели смертности преимущественно наблюдаются у лиц старше 65 лет и детей до 2 лет. Возбудителем данного заболевания является РНК-содержащий вирус гриппа. Высокая изменчивость вирусной РНК, мутации, вызванные прогрессирующим антигенным дрейфом, обуславливают возникновение ежегодных эпидемий гриппа и увеличение количества летальных исходов [2]. В настоящее время для лечения и профилактики инфекции гриппа используются *специфические и неспецифические методы терапии* [3]. *Специфическая терапия* включает в себя два класса лекарственных средств, таких как ингибиторы нейраминидазы и ингибиторы М2-белка. Специфическая профилактика проводится с использованием противогриппозной вакцины. Для *неспецифического лечения* гриппа применяют препараты интерферона и индукторы интерферона. Высокие темпы мутаций в генетическом материале вируса гриппа и развитие резистентности к ныне существующим препаратам побуждают мировое научное сообщество к разработке новых или совершенствованию ныне существующих лекарственных средств для лечения и профилактики гриппозной инфекции.

Данный обзор содержит подробную информацию о применяемых в настоящее время в медицине противовирусных препаратах, а также о субстанциях, которые в перспективе могут стать препаратами для лечения и профилактики вируса гриппа.

Общая характеристика вируса гриппа

Вирус гриппа принадлежит к семейству Orthomyxoviridae и включает в себя 4 рода: А, В, С и D. Вирус гриппа D был выявлен достаточно недавно в США у крупного рогатого скота [4], В и С инфицируют только человека, вирус гриппа А – зооантропоноз. Наибольшее видовое разнообразие представлено у вируса гриппа А – около 18 серотипов, которые отличаются вариациями основных поверхностных антигенов вируса гриппа – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), в связи с чем именно вирус гриппа А является основным этиологическим фактором возникновения ежегодных эпидемий и пандемий гриппа [5]. Данные белки играют важную роль в жизненном цикле вируса гриппа. Благодаря НА происходит адгезия вируса с клеткой-хозяином и последующее проникновение внутрь клетки. Нейраминидаза – трансмембранный гликопротеин, благодаря которому происходит отделение вирионов от клетки-хозяина, способствуя последующему развитию инфекции [6]. НА и НА являются основными белками вируса гриппа, на которые направлен противовирусный иммунитет, поэтому в процессе эволюции, мутированию в основном подвергаются эти белки. В настоящее время у вируса гриппа А описаны 18 подтипов НА и 10 подтипов НА [7]. Также немаловажную роль в проникновении вируса внутрь клетки играет белок М2. Он представляет собой тетрамерный протон-селективный канал, который, перекачивая ионы водорода внутрь вириона, способствует декапсидизации вируса и высвобождению РНК [8]. Перечисленные белки выступают в качестве мишеней лекарственных препаратов, широко используемых в медицине. Длительное применение одних и тех же препаратов приводит к возникновению устойчивости вируса гриппа к этим средствам. Для преодоления этой проблемы при разработке новых фармацевтических субстанций осуществляется поиск новых мишеней, а также химическая модификация ныне существующих молекул.

Специфическая профилактика гриппа

На сегодняшний момент не существует препаратов, защищающих от вируса гриппа на 100 %. Наиболее эффективным методом специфической профилактики является вакцинация. Существует три основных типа противогриппозных вакцин [9]. Живые аттенуированные вакцины содержат ослабленные вирионы и вводятся интраназально. Хотя данный тип вакцинации наиболее приближен к естественной инфекции, эффективность не всегда оправдана, так как при введении через нос количество попавшего в организм вируса непостоянно. Кроме того, живые вакцины, как наиболее реактогенные, часто вызывают аллергические реакции и осложнения, поэтому не рекомендуются к использованию у детей до 2 лет и пожилых пациентов. Инактивированные вакцины содержат убитые цельные либо расщепленные вирионы, и вводятся подкожно, при этом дозировка вируса полностью попадает в организм, но процедура вакцинации малоприятна, в месте введения появляются боль, покраснение, припухлости. Субъединичные вакцины состоят из вирусных белков, а именно HA и NA, проявляющих выраженные антигенные свойства. Данные вакцины являются наиболее безопасными, так как очищены от посторонних белков, которые могут вызывать серьезные побочные эффекты. Однако реактогенность таких вакцин наименьшая, потому что вводятся не цельные вирионы, а только их составляющие.

Чаще всего сезонные эпидемии вызывают штаммы вируса гриппа A H1N1 и H3N1, а также в меньшей степени вирусы гриппа B. На их основе разрабатываются ежегодные противогриппозные вакцины. Однако стремительная изменчивость вируса гриппа A, обусловленная антигенным дрейфом HA и NA, приводит к снижению эффективности вакцинации из-за отсутствия перекрестного иммунитета к разным штаммам вируса [10]. Это означает, что раз в 2–3 года или даже ежегодно должны разрабатываться новые вакцины на основе штаммов вируса, циркулирующих в это время. Исследования в США показали, что эффективность вакцинации в 2017–2018 гг. составляла 36 %, из них 67 % против вируса гриппа A(H1N1), 42 % против вируса гриппа B и 25 % против вируса гриппа A(H3N2) [11]. Сейчас интенсивно ведутся исследования по разработке инновационных противогриппозных вакцин. В 2017 г. в США была разработана вакцина на основе гемагглютинаина вируса гриппа A(H7N9), которая в данный момент проходит клинические испытания [12]. Также клинические испытания проходит разработанная в США в 2018 г. живая аттенуированная вакцина против штамма гриппа H3N2, которая показала свою эффективность и безопасность у взрослых, и на данный момент проходят исследования на детях [13].

Ингибиторы нейраминидазы

Нейраминидаза – поверхностный белок вируса гриппа, играющий важную роль в распространении вируса между клетками-мишенями. Он проявляет

ферментативную активность, расщепляя α-гликозидную связь между сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислотой на поверхности клетки и сахарным остатком HA вируса [14]. При этом образовавшиеся вирионы способны отщепляться от клеточной мембраны и заражать соседние клетки. Также ферментативная активность NA обеспечивает продвижение вируса через слизистую дыхательных путей, богатую сиаловыми кислотами [15].

В 1990-х годах были синтезированы препараты, ингибирующие функцию NA. Они являются аналогами сиаловой кислоты и конкурентно связываются с активным центром NA, нарушая высвобождение вирусного потомства из инфицированной клетки. В настоящее время ингибиторы NA – единственные препараты, рекомендованные для лечения инфекции вируса гриппа. Основными используемыми во всем мире препаратами ингибиторами NA являются осельтамивир и занамивир (рисунок 1). Ланинамивир одобрен для применения в Японии, а перамивир – в Китае, Японии, Южной Корее и США [16].

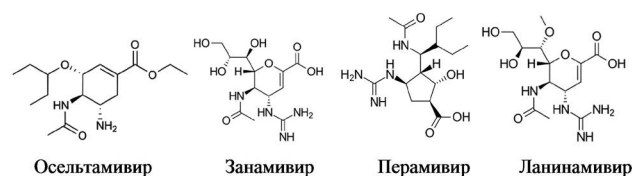


Рисунок 1. Структурные формулы ингибиторов нейраминидазы

Figure 1. Structural formulas of neuraminidase inhibitors

По данным рандомизированных плацебо-контролируемых двойных слепых исследований эффективности осельтамивира, при применении данного препарата перорально в дозировке 75 мг отмечалось сокращение времени проявления симптомов гриппа на 21 % (с 122,7 ч. до 97,5 ч.) в сравнении с группой плацебо при условии приема препарата сразу после появления первых симптомов [17]. При этом эффективность остальных препаратов в целом была сопоставима с эффективностью осельтамивира. Ввиду низкой биодоступности занамивир и ланинамивир вводятся ингаляционно, а перамивир – внутримышечно, что вызывает некоторые ограничения при применении, в отличие от вводимого перорально осельтамивира.

Согласно информации, приведенной в обзоре относительно профилактики и лечения гриппа ингибиторами NA, данные препараты снижают длительность симптоматики гриппа менее чем на сутки [18]. Однако не было выявлено значительного уменьшения частоты осложнений гриппа, например, пневмонии, а также частоты госпитализаций и смертельных исходов. При использовании осельтамивира были зарегистрирова-

ны нежелательные явления, такие как тошнота, рвота, психоневрологические расстройства, нефротоксичность, гепатотоксичность, аритмии [18]. Профилактический эффект ингибиторов NA не оправдан, так как для этого необходим 8-недельный курс препарата, а возникновение побочных эффектов снижало бы качество жизни пациентов.

С 2007 по 2009 гг. были обнаружены вирусы гриппа, устойчивые к ингибиторам NA, при этом резистентность за этот период в некоторых случаях увеличилась с 1 % до 90 % [19, 20]. Было выявлено, что устойчивые к ингибиторам NA вирусы гриппа имели несколько мутаций в гене нейраминидазы, из которых наиболее распространенной являлась H274Y. Это приводило к конформационным изменениям в NA и нарушению связывания с ней лекарственного препарата. В настоящее время большинство вирусов гриппа все еще чувствительны к ингибиторам NA, однако эволюционирование вируса гриппа может все изменить в противоположную сторону. В связи с этим необходима разработка новых препаратов, которые не только позволят преодолеть резистентность, но и смогут повысить эффективность лечения инфекции гриппа на более поздних сроках заболевания.

Ингибиторы M2-канала

Некоторые высокопатогенные вирусы человека, такие как вирус гриппа А, вирус иммунодефицита человека 1, вирус гепатита С продуцируют белки, способные образовывать ионопроводящие поры в мембране – *виropорины* [21]. Они нарушают ионный гомеостаз клетки – мишени в пользу вируса для обеспечения правильной репликации и сборке вирусных частиц. M2-белок вируса гриппа А олигомеризуется и встраивается в вирусную оболочку, образуя протонселективный ионный канал. M2-канал играет важную роль в проникновении вируса гриппа в клетку, а также создает необходимые условия для сборки вирусных частиц [22]. Закисление содержимого эндосомы, образовавшейся после проникновения вируса в клетку, активирует M2-канал, при этом происходит перекачка протонов внутрь вируса. Кислая среда способствует диссоциации РНК и белкового комплекса, а также расщеплению вирусной мембраны и последующему выходу РНК в цитоплазму клетки для последующей репликации.

С 1966 г. единственными противовирусными препаратами, ингибирующими функцию M2-канала вируса гриппа и разрешенными к медицинскому применению являются производные адамантана – *амантадин* и *римантадин* (рисунок 2).

В течение многих десятилетий производные адамантана применялись для профилактики и лечения гриппа. По данным исследований, амантадин уменьшал частоту возникновения гриппа А в среднем на 61 %, а длительность симптоматики гриппа сокраща-

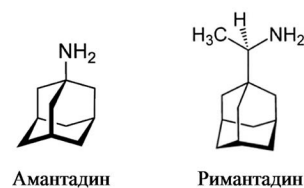


Рисунок 2. Структурные формулы ингибиторов M2-канала

Figure 2. Structural formulas of M2 channel inhibitors

лась приблизительно на 1 день [23]. При этом римантадин имел сопоставимую с амантадином эффективность, но ввиду отсутствия достаточного количества испытаний, данные по профилактике не были статистически значимыми. Однако интенсивное применение ингибиторов M2-канала привело к возникновению к ним устойчивости вирусов гриппа. По данным эпидемиологического надзора США по всему миру в период с 1995 по 2004 гг. произошел рост резистентности вирусов гриппа к амантадину и римантадину с 0,4 % до 12,3 % соответственно [24]. В США этот рост составлял от 1,9 % до 14,5 %. Проведение генотипирования, изолированных в 2005 г. вирусов гриппа А, показало, что более 90 % всех изолятов, имеющих устойчивость к адамантанам, содержали точечные мутации в гене M2-белка. Это приводило к аминокислотным заменам в самом белке. Самой распространенной заменой являлась S31N (замена серина в 31 положении на аспарагин) [25]. По информации центров по контролю и профилактике заболеваний США в настоящий момент практически 100 % вирусов гриппа устойчивы к действию амантадина и римантадина [26], поэтому дальнейшее применение этих препаратов для профилактики и лечения инфекции гриппа является нецелесообразным. Введение дополнительных функциональных групп в молекулы адамантанов, вероятно, сможет реанимировать противовирусную активность этих препаратов при последующей разработке.

В данный момент проходят доклинические испытания нового перспективного препарата, производного римантадина – гистидил-1-адамантаилэтиламина (H-His-Rim) (рисунок 3).

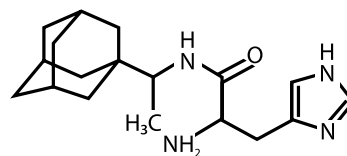


Рисунок 3. Структурная формула гистидил-1-адамантаилэтиламина (H-His-Rim)

Figure 3. The structural formula of histidyl-1-adamantylethylamine (H-His-Rim)

Исследования данного препарата *in vitro* на клеточной культуре MDCK показали, что H-His-Rim уменьшал репродукцию вируса гриппа А(H1N1) pdm на 91 %,

А(Н3N2) на 94 % [27]. Испытания *in vivo* проводились на мышах. В этом случае эффективность препарата была ниже, чем на культуре клеток и составляла около 40 % [28], а токсичность соединения была ниже, чем у римантадина. Поэтому Н-His-Rim можно рассматривать как перспективную субстанцию для проведения клинических исследований для лечения и профилактики гриппа.

Ингибиторы гемагглютинина

Немаловажное значение при заражении вирусом гриппа имеет *гемагглютинин* (НА), который представляет собой гомотримерный гликопротеин, обеспечивающий слияние и проникновение вируса гриппа в клетку-мишень [29]. Рецепторами к НА являются остатки сиаловых кислот на поверхности чувствительных клеток. При их взаимодействии с гемагглютинином происходит рецептор – опосредованный эндоцитоз и вирус в виде эндосомы проникает внутрь клетки. Снижение pH в эндосоме приводит к конформационным изменениям в НА, при этом вирусная и клеточная мембраны сливаются, после чего генетический материал вируса транспортируется в ядро клетки для репликации. НА является наиболее перспективной мишенью для противовирусных средств, так как такие препараты ингибируют начальную стадию заражения, предотвращая проникновение вируса в клетку.

В настоящее время на фармацевтическом рынке в качестве ингибитора НА представлен препарат *арбидол* (умифеновир) (рисунок 4).

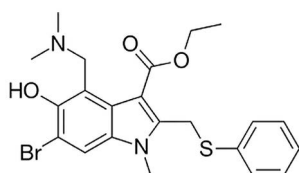


Рисунок 4. Структурная формула умифеновира (арбидола)

Figure 4. The structural formula of arbidol (umifenovir)

Уже более 20 лет арбидол используется в России в качестве средства для лечения и профилактики гриппа. Проведенные исследования механизма действия показали, что арбидол связывается с гемагглютинином вируса гриппа, стабилизирует его, предотвращая связывание НА с рецепторами клетки-мишени [30, 31]. По данным клинических исследований арбидола эффективность и безопасность, а также профилактическое действие арбидола были выше, чем таковые у ингибиторов НА и М2-белка [32]. Применение арбидола при гриппозной инфекции сокращало среднюю продолжительность заболевания приблизительно на 2 дня. При этом, по сравнению с римантадином, отсутствовали осложнения у пациентов с хроническими за-

болеваниями. При исследованиях арбидола как профилактического средства против вируса гриппа было выявлено, что число заболевших сокращалось на 86 % по сравнению с контрольной группой. Еще одним преимуществом арбидола перед перечисленными ранее препаратами является высокая чувствительность к нему вирусов гриппа. Анализ изолятов, выделенных в период 2004–2005 гг., не выявил ни одного штамма, резистентного к арбидолу [33].

Таким образом, по данным многолетних исследований арбидол обладает высокой эффективностью против вируса гриппа, выраженным профилактическим эффектом, а также хорошей переносимостью. Однако, согласно сообщению ВОЗ [34], данные об эффективности арбидола являются сомнительными, информации по клиническим испытаниям недостаточно, чтобы соответствовать требованиям доказательной медицины, поэтому ВОЗ рекомендует с осторожностью интерпретировать результаты исследований. В последующие годы был проведен ряд исследований, в том числе зарубежных [35, 36], подтверждающих противовирусное действие арбидола. В 2012 г. фирма-производитель препарата арбидол «Фармстандарт» инициировала проведение нового клинического исследования эффективности против вируса гриппа под названием «АРБИТР» [37]. Согласно промежуточным результатам [38] прием препарата в течение первых 2–3 суток приводил к облегчению тяжести заболевания, уменьшению выраженности симптомов и интоксикации. В 2017 г. американские ученые с использованием рентгеноструктурного анализа подтвердили, что молекула арбидола действительно связывается с гемагглютинином вируса гриппа и блокирует его [39].

В настоящий момент ведутся интенсивные исследования и разработка препаратов, оказывающих ингибирующее действие на гемагглютинин вируса гриппа. Особый интерес представляют препараты на основе моноклональных антител. В 2009–2011 гг. появились сведения об исследованиях препаратов CR6261 [40] и CR8020 [41] на основе человеческих моноклональных антител к НА вируса гриппа. Было показано, что данные препараты обладали нейтрализующим действием в отношении 5 штаммов вируса гриппа H5N1 и H1N1. При применении у мышей в течение 5 дней после заражения защищали их от летального исхода. Сейчас данные препараты находятся на стадии клинических исследований 2-й фазы для оценки эффективности у инфицированных гриппом пациентов [42, 43].

Противогриппозные препараты других классов

В 2018 г. появилась информация о проведении в Японии клинических исследований [44] нового единственного в своем классе противовирусного препарата – *балоксавира марбоксила* (рисунок 5).

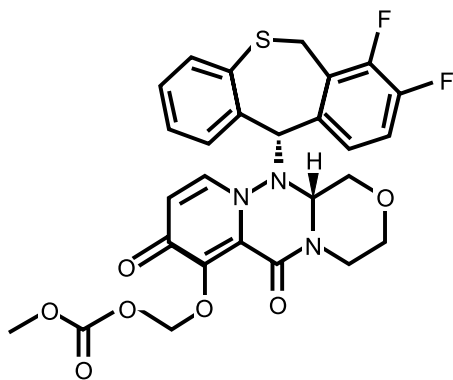


Рисунок 5. Структурная формула балоксавира марбоксила (ксофлюза)

Figure 5. The structural formula of baloxavir marboxyl (xoflusa)

Действие балоксавира связано с подавлением репликации вируса гриппа [45]. После попадания вируса в клетку и высвобождения геномной РНК первоначально происходит синтез мРНК для дальнейшего производства вирусных частиц. Инициацию синтеза мРНК осуществляет кэп-зависимая эндонуклеаза, которая образует кэпированный праймер для работы вирусной РНК-полимеразы. Балоксавир, связываясь с кэп-зависимой эндонуклеазой, блокирует ее функцию и последующий синтез мРНК.

По данным клинических исследований балоксавир имел достаточную эффективность против вируса гриппа, применение препарата приводило к сокращению продолжительности симптоматики приблизительно на сутки (23–28 ч.), по сравнению с группой плацебо. Однако неблагоприятные явления были зарегистрированы у 20 % пациентов, в сравнении с 24,5 % группы плацебо и группы осельтамивира. Явным преимуществом балоксавира является его однократное применение в течение первых 48 ч. после появления симптоматики. В данный момент препарат одобрен в Японии и США, и в дальнейшем ожидается появление его на рынках других стран.

Еще одним экспериментальным противовирусным препаратом, исследования которого также проходят в Японии, является *фавипиравир* (рисунок 6).

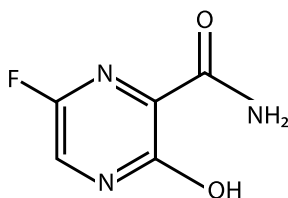


Рисунок 6. Структурная формула фавипиравира

Figure 6. Structural formula of favipiravir

По результатам исследований у фавипиравира была выявлена активность в отношении широко-го спектра РНК-содержащих вирусов, таких как вирус

гриппа (А, В и С), вирус лихорадки Западного Нила, вирус жёлтой лихорадки, вирус ящура [46], а также на модели мышей была показана эффективность против вируса Эбола. Фавипиравир так же, как и балоксавир, блокирует репликацию вируса гриппа, прямо влияя на его воспроизводство. Его мишенью является важный для репликации фермент РНК-зависимая РНК-полимераза. На этапе доклинических исследований фавипиравир проявил более высокую эффективность и безопасность *in vitro* и *in vivo* по сравнению с ингибиторами NA и M2-белка [47]. В настоящий момент препарат проходит клинические испытания 3-й фазы в Японии и США. Имея широкий спектр противовирусной активности, фавипиравир имеет высокие шансы вырваться в лидеры среди противогриппозных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Грипп – одна из главных проблем общественного здравоохранения. Наиболее эффективный способ борьбы с гриппом является профилактика. Основу профилактики составляет ежегодная вакцинация. Однако вакцины необходимо периодически обновлять из-за возникновения новых вариаций вируса гриппа. Современная терапия гриппа включает в себя два основных класса соединений – ингибиторы NA и ингибиторы M2-белка. Блокаторы M2, такие как амантадин и римантадин, потеряли свою актуальность в связи с развитием высокой устойчивости к ним вирусов гриппа. Ингибиторы нейраминидазы – осельтамивир, занамивир все еще эффективны против гриппозной инфекции, однако наличие серьезных побочных эффектов, а также появление устойчивых к ним вирусов гриппа приводит к ограничениям в применении этих препаратов. Российский препарат арбидол (умифеновир) показал высокие эффективность и безопасность в клинических исследованиях, но по данным экспертов ВОЗ, его эффективность необходимо дополнительно исследовать. Создание новых или модификация существующих соединений играет важную роль в борьбе с гриппом.

Для реанимирования противовирусных свойств адамантанов было синтезировано соединение, производное римантадина, гистидил-1-адамантаилэтиламин, которое продемонстрировало достаточную противовирусную активность на этапе доклинических испытаний. В дальнейшем после прохождения клинических исследований данная субстанция может стать активным фармацевтическим ингредиентом лекарственного препарата.

Препараты балоксавир и фавипиравир – новое поколение противовирусных средств, находящихся на этапе исследования эффективности и безопасности у пациентов с гриппом. По завершению клинических испытаний препараты могут войти в список наиболее эффективных для профилактики и лечения гриппозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Iuliano A. D., Roguski K. M., Chang H. H., Muscatello D. J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J. M., Schanzer D., Cowling B. J., Wu P., Kynd J., Ang L. W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., Pereira da Silva S., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M. A., Bresee J. S. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018; 391(10127): 1285–1300. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2.
- Hay A. J., Gregory V., Douglas A. R., Lin Y. P. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356 (1416): 1861–1870. Doi: 10.1098 / rstb.2001.0999.
- Bearman G. M., Shankaran S., Elam K. Treatment of severe cases of pandemic (H1N1) 2009 influenza: review of antivirals and adjuvant therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2010; 5 (2): 152–156.
- Ferguson L., Eckard L., Epperson W. B., Long L. P., Smith D., Huston C., Genova S., Webby R., Wan X. F. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology*. 2015; 486: 28–34. Doi: 10.1016/j.virol.2015.08.030.
- Hutchinson E. C. Influenza Virus. *Trends Microbiol*. 2018; 26 (9): 809–810. Doi: 10.1016/j.tim.2018.05.013.
- Jagadesh A., Salam A. A., Mudgal P. P., Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol*. 2016; 161(8): 2087–2094. Doi: 10.1007/s00705-016-2907-7.
- Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L. M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P. J., Gilbert A. T., Chang J., Guo Z., Davis C. T., Paulson J. C., Stevens J., Rupprecht C. E., Holmes E. C., Wilson I. A., Donis R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003657. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
- Pinto L. H., Holsinger L. J., Lamb R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 1992; 69(3): 517–528. Doi: 10.1016/0092-8674(92)90452-i.
- Голубовская О. А., Шкурба А. В. Вакцинопрофилактика гриппа в современных условиях. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2013; 3(06): 145–154.
- Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*. 2003; 21 (16): 1776–1779. doi: 10.1016/S0264-410X(03)00071-9.
- Mossad S. B. Influenza update 2018–2019: 100 years after the great pandemic. *Cleve Clin J Med*. 2018; 85(11): 861–869. Doi: 10.3949/ccjm.85a.18095.
- Safety/Efficacy Study of Seqirus A/H7N9 IIV With or Without MF59(R) Adjuvant to Prevent Avian Influenza. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2018] – [cited 2019 Nov 22]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/keydates/NCT03682120>.
- Safety and Immunogenicity Study of an Influenza Vaccination Strategy Including a H3N2 M2SR Prime Followed by a Seasonal Quadrivalent Inactivated Vaccine Boost in a Pediatric Population 9–17 Years Old ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2018] – [cited 2019 Nov 22]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03553940>.
- Shtyrya Y. A., Mochalova L. V., Bovin N. V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae*. 2009; 1(2): 26–32.
- Cohen M., Zhang X. Q., Senaati H. P., Chen H. W., Varki N. M., Schooley R. T., Gagneux P. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Viol J*. 2013; 10: 321. Doi: 10.1186/1743-422X-10-321.
- Ison M. G. Antiviral Treatments. *Clin Chest Med*. 2017; 38(1): 139–153. Doi: 10.1016/j.ccm.2016.11.008.
- Dobson J., Whitley R. J., Pocock S., Monto A. S. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet*. 2015; 385(9979): 1729–1737. Doi: 10.1016/S0140-6736(14)62449-1.
- Jefferson T., Jones M. A., Doshi P., Del Mar C. B., Hama R., Thompson M. J., Spencer E. A., Onakpoya I., Mahtani K. R., Nunan D., Howick J., Heneghan C. J. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 4: CD008965. Doi: 10.1002/14651858.CD008965.pub4.
- Dharan N. J., Gubareva L. V., Meyer J. J., Okomo-Adhiambo M., McClinton R. C., Marshall S. A., St George K., Epperson S., Brammer L., Klimov A. I., Bresee J. S., Fry A. M. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA*. 2009; 301(10): 1034–1041. Doi: 10.1001/jama.2009.294.
- Hurt A. C., Holien J. K., Parker M. W., Barr I. G. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. *Drugs*. 2009; 69(18): 2523–2531. Doi: 10.2165/11531450-000000000-00000.
- Nieva J. L., Madan V., Carrasco L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(8): 563–574. Doi: 10.1038/nrmicro2820.
- Nieto-Torres J. L., Verdiá-Báguena C., Castaño-Rodríguez C., Aguilera V. M., Enjuanes L. Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis. *Viruses*. 2015; 7(7): 3552–3573. Doi: 10.3390/v7072786.
- Jefferson T., Demicheli V., Di Pietrantonj C., Rivetti D. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 2: CD001169. Doi: 10.1002/14651858.CD001169.pub3.
- Bright R. A., Medina M. J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T. R., Davis X. M., Povinelli L., Cox N. J., Klimov A. I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005; 366(9492): 1175–1181. Doi: 10.1016/S0140-6736(05)67338-2.
- Bright R. A., Shay D. K., Shu B., Cox N. J., Klimov A. I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006; 295(8): 891–894. Doi: 10.1001/jama.295.8.joc60020.
- Fiore A. E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J. S., Uyeki T. M. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011; 60(1): 1–24.
- Шибнев В. А., Гараев Т. М., Финогонова М. П., Шевченко Е. С., Бурцева Е. И. Новые производные адамантана, способные преодолеть резистентность вирусов гриппа A(H1N1)pdm2009 и A(H3N2) к «ремантадину». *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153(2): 200–202.
- Щелканов М. Ю., Шибнев В. А., Финогонова М. П., Федякина И. Т., Гараев Т. М., Маркова Н. В., Кириллов И. М. Противовирусная активность производных адамантана в отношении вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на модели *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 37–40.
- Jiang S., Li R., Du L., Liu S. Roles of the hemagglutinin of influenza A virus in viral entry and development of antiviral therapeutics and vaccines. *Protein Cell*. 2010; 1(4): 342–354. Doi: 10.1007/s13238-010-0054-6.
- Ленева И. А., Russell R. J., Boriskin Y. S., Hay A. J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res*. 2009; 81(2): 132–140. Doi: 10.1016/j.antiviral.2008.10.009.
- Nasser Z. H., Swaminathan K., Müller P., Downard K. M. Inhibition of influenza hemagglutinin with the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral Res*. 2013; 100(2): 399–406. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.021.
- Ленева И. А., Гуськова Т. А. Арбидол – эффективный препарат для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ: обзор результатов клинических исследований. *Русский медицинский журнал*. 2008; 29(16): 3–7.
- Бурцева Е. И., Шевченко Е. С., Ленева И. А., Меркулова Л. Н., Осерко Т. А., Шляпникова О. В., Заплатников А. Л., Шустер А. М., Слепушкин А. Н. Чувствительность к ремантадину и Арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004–2005 г. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(2): 24–29.

34. World Health Organisation (WHO) (2010) WHO guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A(H1N1) 2009 and other influenza viruses. Part II: Review of evidence. Available at: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt_part2.pdf?ua=1.
35. Liu Q., Xiong H. R., Lu L., Liu Y. Y., Luo F., Hou W., Yang Z. Q. Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A(H1N1) virus infection. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34(8): 1075–1083. Doi: 10.1038/aps.2013.54.
36. Wang Y., Ding Y., Yang C., Li R., Du Q., Hao Y., Li Z., Jiang H., Zhao J., Chen Q., Yang Z., He Z. Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride in vitro and in vivo (mice and ferret). *Biomed Pharmacother.* 2017; 91: 393–401. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.091.
37. A Study of Arbidol (Umifenovir) for Treatment and Prophylaxis of Influenza and Common Cold (ARBITR). ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2012] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01651663>.
38. Киселев О. И., Малеев В. В., Деева Э. Г., Ленева И. А., Селькова Е. П., Осипова Е. А., Обухов А. А., Надоров С. А., Куликова Е. В. Клиническая эффективность препарата Арбидол (умифеновир) в терапии гриппа у взрослых: промежуточные результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования АРБИТР. *Терапевтический архив.* 2015; 87(1): 88–96. Doi: 10.17116/terarkh201587188-96.
39. Kadam R. U., Wilson I. A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(2): 206–214. Doi: 10.1073/pnas.1617020114.
40. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L. L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One.* 2008; 3(12): e3942. Doi: 10.1371/journal.pone.0003942.
41. Ekiert D. C., Friesen R. H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H. J., Brandenburg B., Vogels R., Brakenhoff J. P., Kompier R., Koldijk M. H., Cornelissen L. A., Poon L. L., Peiris M., Koudstaal W., Wilson I. A., Goudsmit J. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science.* 2011; 333(6044): 843–850. Doi: 10.1126/science.1204839.
42. Evaluation of the Protective Efficacy and Safety of CR8020 in an Influenza Challenge. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2013] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/keydates/NCT03682120>.
43. Study in Healthy Volunteers to Evaluate the Efficacy and Safety of CR6261 in an H1N1 Influenza Healthy Human Challenge Model. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2015] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371668>.
44. Hayden F. G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M. D., Hurt A. C., Ishida T., Sekino H., Yamada K., Portsmouth S., Kawaguchi K., Shishido T., Arai M., Tsuchiya K., Uehara T., Watanabe A. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med.* 2018; 379(10): 913–923. Doi: 10.1056/NEJMoa1716197.
45. Takashita E., Morita H., Ogawa R., Nakamura K., Fujisaki S., Shirakura M., Kuwahara T., Kishida N., Watanabe S., Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol.* 2018; 9: 3026. Doi: 10.3389/fmicb.2018.03026.
46. Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K., Sakamoto K., Smee D. F., Barnard D. L., Gowen B. B., Julander J. G., Morrey J. D. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res.* 2009; 82(3): 95–102. Doi: 10.1016/j.antiviral.2009.02.198.
47. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 446–454. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.

REFERENCES

1. Iuliano A. D., Roguski K. M., Chang H. H., Muscatello D. J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J. M., Schanzer D., Cowling B. J., Wu P., Kyncl J., Ang L. W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., Pereira da Silva S., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M. A., Bresee J. S. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet.* 2018; 391(10127): 1285–1300. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2.
2. Hay A. J., Gregory V., Douglas A. R., Lin Y. P. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356 (1416): 1861–1870. Doi: 10.1098/rstb.2001.0999.
3. Bearman G. M., Shankaran S., Elam K. E. Treatment of severe cases of pandemic (H1N1) 2009 influenza: review of antivirals and adjuvant therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2010; 5 (2): 152–156.
4. Ferguson L., Eckard L., Epperson W. B., Long L. P., Smith D., Huston C., Genova S., Webby R., Wan X. F. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. *Virology.* 2015; 486: 28–34. Doi: 10.1016/j.virol.2015.08.030.
5. Hutchinson E. C. Influenza Virus. *Trends Microbiol.* 2018; 26 (9): 809–810. Doi: 10.1016/j.tim.2018.05.013.
6. Jagadesh A., Salam A. A., Mudgal P. P., Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines. *Arch Virol.* 2016; 161(8): 2087–2094. Doi: 10.1007/s00705-016-2907-7.
7. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L. M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P. J., Gilbert A. T., Chang J., Guo Z., Davis C. T., Paulson J. C., Stevens J., Rupprecht C. E., Holmes E. C., Wilson I. A., Donis R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003657. Doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
8. Pinto L. H., Holsinger L. J., Lamb R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 1992; 69(3): 517–528. Doi: 10.1016/0092-8674(92)90452-i.
9. Golubovskaja O. A., Shkurba A. V. Flu vaccinal prevention in modern conditions. *Clinical Infectology and Parasitology.* 2013; 3(06): 145–154 (in Russ.).
10. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine.* 2003; 21 (16): 1776–1779. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00071-9.
11. Mossad S. B. Influenza update 2018–2019: 100 years after the great pandemic. *Cleve Clin J Med.* 2018; 85(11): 861–869. Doi: 10.3949/ccjm.85a.18095.
12. Safety/Efficacy Study of Seqirus A/H7N9 IIV With or Without MF59(R) Adjuvant to Prevent Avian Influenza. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2018] – [cited 2019 Nov 22]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/keydates/NCT03682120>.
13. Safety and Immunogenicity Study of an Influenza Vaccination Strategy Including a H3N2 M2SR Prime Followed by a Seasonal Quadrivalent Inactivated Vaccine Boost in a Pediatric Population 9–17 Years Old. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2018] – [cited 2019 Nov 22]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03553940>.
14. Shtyrya Y. A., Mochalova L. V., Bovin N. V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae.* 2009; 1(2): 26–32.
15. Cohen M., Zhang X. Q., Senaati H. P., Chen H. W., Varki N. M., Schooley R. T., Gagneux P. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virol J.* 2013; 10: 321. Doi: 10.1186/1743-422X-10-321.
16. Ison M. G. Antiviral Treatments. *Clin Chest Med.* 2017; 38(1): 139–153. Doi: 10.1016/j.ccm.2016.11.008.
17. Dobson J., Whitley R. J., Pocock S., Monto A. S. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet.* 2015; 385(9979): 1729–1737. Doi: 10.1016/S0140-6736(14)62449-1.
18. Jefferson T., Jones M. A., Doshi P., Del Mar C. B., Hama R., Thompson M. J., Spencer E. A., Onakpoya I., Mahtani K. R., Nunn D., Howick J., Heneghan C. J. Neuraminidase inhibitors for preventing and

- treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 4: CD008965. Doi: 10.1002/14651858.CD008965.pub4.
19. Dharan N. J., Gubareva L. V., Meyer J. J., Okomo-Adhiambo M., McClinton R. C., Marshall S. A., St George K., Epperson S., Brammer L., Klimov A. I., Bresee J. S., Fry A. M. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA*. 2009; 301(10): 1034–1041. Doi: 10.1001/jama.2009.294.
 20. Hurt A. C., Holien J. K., Parker M. W., Barr I. G. Oseltamivir resistance and the H274Y neuraminidase mutation in seasonal, pandemic and highly pathogenic influenza viruses. *Drugs*. 2009; 69(18): 2523–2531. Doi: 10.2165/11531450-000000000-00000.
 21. Nieva J. L., Madan V., Carrasco L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(8): 563–574. Doi: 10.1038/nrmicro2820.
 22. Nieto-Torres J. L., Verdiá-Báguena C., Castaño-Rodríguez C., Aguilera V. M., Enjuanes L. Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis. *Viruses*. 2015; 7(7): 3552–3573. Doi: 10.3390/v7072786.
 23. Jefferson T., Demicheli V., Di Pietrantonj C., Rivetti D. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 2: CD001169. Doi: 10.1002/14651858.CD001169.pub3.
 24. Bright R. A., Medina M. J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T. R., Davis X. M., Povinelli L., Cox N. J., Klimov A. I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005; 366(9492): 1175–1181. Doi: 10.1016/S0140-6736(05)67338-2.
 25. Bright R. A., Shay D. K., Shu B., Cox N. J., Klimov A. I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA*. 2006; 295(8): 891–894. Doi: 10.1001/jama.295.8.joc60020.
 26. Fiore A. E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J. S., Uyeki T. M. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2011; 60(1): 1–24.
 27. Shibnev V. A., Garaev T. M., Finogenova M. P., Shevchenko E. S., Burtseva E. I. New adamantane derivatives can overcome resistance of influenza A(H1N1)pdm2009 and A(H3N2) viruses to «remantadine». *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012; 153(2): 200–202 (in Russ.).
 28. Shhelkanov M. Ju., Shibnev V. A., Finogenova M. P., Fedjakina I. T., Garaev T. M., Markova N. V., Kirillov I. M. The antiviral activity of the adamantane derivatives against the influenza virus A (H1N1) pdm09 model in vivo. *Problems of virology*. 2014; 59(2): 37–40 (in Russ.).
 29. Jiang S., Li R., Du L., Liu S. Roles of the hemagglutinin of influenza A virus in viral entry and development of antiviral therapeutics and vaccines. *Protein Cell*. 2010; 1(4): 342–354. Doi: 10.1007/s13238-010-0054-6.
 30. Leneva I. A., Russell R. J., Boriskin Y. S., Hay A. J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res*. 2009; 81(2): 132–140. Doi: 10.1016/j.antiviral.2008.10.009.
 31. Nasser Z. H., Swaminathan K., Müller P., Downard K. M. Inhibition of influenza hemagglutinin with the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral Res*. 2013; 100(2): 399–406. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.021.
 32. Leneva I. A., Gus'kova T. A. Arbidol is an effective drug for the treatment and prevention of influenza and acute respiratory viral infections: a review of clinical trial results. *Russian medical journal*. 2008; 29(16): 3–7 (in Russ.).
 33. Burtseva Ye. I., Shevchenko Ye. S., Leneva I. A., Merkulova L. N., Oskerkov T. A., Shlyapnikova O. V., Zaplatnikov A. L., Shuster A. M., Slepishkin A. N. Rimantadine and arbidol sensitivity of influenza viruses that caused epidemic morbidity rise in Russia in the 2004–2005 season. *Problems of virology*. 2007; 52(2): 24–29 (in Russ.).
 34. World Health Organisation (WHO) (2010) WHO guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A(H1N1) 2009 and other influenza viruses. Part II: Review of evidence. Available at: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt_part2.pdf?ua=1.
 35. Liu Q., Xiong H. R., Lu L., Liu Y. Y., Luo F., Hou W., Yang Z. Q. Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A(H1N1) virus infection. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(8): 1075–1083. Doi: 10.1038/aps.2013.54.
 36. Wang Y., Ding Y., Yang C., Li R., Du Q., Hao Y., Li Z., Jiang H., Zhao J., Chen Q., Yang Z., He Z. Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride in vitro and in vivo (mice and ferret). *Biomed Pharmacother*. 2017; 91: 393–401. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.091.
 37. A Study of Arbidol (Umifenovir) for Treatment and Prophylaxis of Influenza and Common Cold (ARBTR). ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2012] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01651663>.
 38. Kiselev O. I., Maleev V. V., Deeva E. G., Leneva I. A., Selkova E. P., Osipova E. A., Obukhov A. A., Nadorov S. A., Kulikova E. V. Clinical efficacy of Arbidol (umifenovir) in the therapy of influenza in adults: Preliminary results of the multicenter double-blind randomized placebo-controlled study ARBTR. *Therapeutic Archive*. 2015; 87(1): 88–96 (in Russ.).
 39. Kadam R. U., Wilson I. A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(2): 206–214. Doi: 10.1073/pnas.1617020114.
 40. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L. L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One*. 2008; 3(12): e3942. Doi: 10.1371/journal.pone.0003942.
 41. Ekiert D. C., Friesen R. H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H. J., Brandenburg B., Vogels R., Brakenhoff J. P., Kompier R., Koldijk M. H., Cornelissen L. A., Poon L. L., Peiris M., Koudstaal W., Wilson I. A., Goudsmit J. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*. 2011; 333(6044): 843–850. Doi: 10.1126/science.1204839.
 42. Evaluation of the Protective Efficacy and Safety of CR8020 in an Influenza Challenge. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2013] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/keydates/NCT03682120>.
 43. Study in Healthy Volunteers to Evaluate the Efficacy and Safety of CR6261 in an H1N1 Influenza Healthy Human Challenge Model. ClinicalTrials.gov [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [2015] – [cited 2020 Jan 19]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371668>.
 44. Hayden F. G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M. D., Hurt A. C., Ishida T., Sekino H., Yamada K., Portsmouth S., Kawaguchi K., Shishido T., Arai M., Tsuchiya K., Uehara T., Watanabe A. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N Engl J Med*. 2018; 379(10): 913–923. Doi: 10.1056/NEJMoa1716197.
 45. Takashita E., Morita H., Ogawa R., Nakamura K., Fujisaki S., Shirakura M., Kuwahara T., Kishida N., Watanabe S., Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol*. 2018; 9: 3026. Doi: 10.3389/fmicb.2018.03026.
 46. Furuta Y., Takahashi K., Shiraki K., Sakamoto K., Smee D. F., Barnard D. L., Gowen B. B., Julander J. G., Morrey J. D. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Res*. 2009; 82(3): 95–102. Doi: 10.1016/j.antiviral.2009.02.198.
 47. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013; 100(2): 446–454. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.

Экспериментальное исследование диффузии иммуномодулятора Галавит® в модельной системе

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

¹ – ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России), 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1

*Контактное лицо: Кузнецова Евгения Геннадьевна. E-mail: kuzeugenia@gmail.com

Статья получена: 17.11.2019. Статья принята к печати: 28.01.2020

Резюме

Введение. Широкое применение в медицинской практике иммуномодуляторов способствует разработке их новых лекарственных форм.

Цель. Целью данной работы является разработка трансдермальной терапевтической системы (ТТС) Галавит® и исследование *in vitro* диффузии ЛВ из нее через мембрану Strat-M.

Материалы и методы. Лекарственной субстанцией служил Галавит® в виде порошка для приготовления раствора для внутримышечного введения («СЭЛВИМ», Россия). В качестве вспомогательных веществ применяли физиологический раствор, додецилсульфат натрия, масло абрикосовых ядер, эмульгатор Decaglyn PR-20 и другие. Для изготовления эмульсионных композиций использовали диспергатор Heidolph DIA900 (Германия) и ультразвуковой гомогенизатор HeiScher UIS250V (Германия). Время расслоения и размер частиц эмульсионных композиций определяли на анализаторе дисперсий LUMiSizer (LUM, Германия). Исследования диффузии Галавит® из ТТС через мембрану Strat-M (25 мм в диаметре, Merck Millipore) проводили на анализаторе диффузии Copley (Великобритания). Количественное определение Галавит® в модельных средах выполняли методом спектрофотометрии (UV-2600 Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 294–298 нм.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования определены характеристические параметры эмульсионных композиций: размер частиц варьировал от 0,1 до 2 мкм, время расслоения – от 9 до 95 мин в зависимости от состава. Максимальный выход лекарственного вещества из ТТС через мембрану составил 30 %.

Заключение. В модельных экспериментах показана возможность трансдермального переноса Галавит® из ТТС.

Ключевые слова: трансдермальная терапевтическая система, иммуномодулятор, эмульсия, размер частиц, мембраны Strat-M, диффузия лекарственного вещества.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Е. Г. Кузнецова и Л. А. Саломатина занимались разработкой эксперимента. Е. Г. Кузнецова, Л. А. Саломатина и О. М. Курылева выполнили всю экспериментальную часть работы. Е. Г. Кузнецова, О. М. Курылева, Л. А. Саломатина, В. И. Севастьянов участвовали в написании текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Для цитирования: Кузнецова Е. Г., Курылева О. М., Саломатина Л. А., Севастьянов В. И. Экспериментальное исследование диффузии иммуномодулятора Галавит® в модельной системе. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020; 9(1): 92–97.

Experimental Investigation of Immunomodulator Galavit® Diffusion in a Model System

Evgeniya G. Kuznetsova^{1*}, Olga M. Kuryleva¹, Lidia A. Salomatina¹, Viktor I. Sevastianov¹

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

*Corresponding author: Evgeniya G. Kuznetsova. E-mail: kuzeugenia@gmail.com

Received: 17.11.2019. Accepted: 28.01.2020

Abstract

Introduction. The widespread use of immunomodulators in medical practice contributes to the development of their new dosage forms.

Aim. The aim of this work is to develop a transdermal therapeutic system (TTS) Galavit® and to study a diffusion of the drug from it through the Strat-M membrane *in vitro*.

Materials and methods. The medicinal substance was Galavit® in the form of a powder for the preparation of a solution for intramuscular administration («SELVIM», Russia). Saline solution, sodium dodecyl sulfate, apricot kernel oil, Decaglyn PR-20 and others were used as excipients. Heidolph DIA900 dispersant (Germany) and ultrasonic homogenizer HeiScher UIS250V (Germany) were used to make the emulsion compositions. The delamination time and particle size of emulsion compositions were determined using the LUMiSizer dispersion analyzer (LUM, Germany). Diffusion studies of Galavit® from TTS through the Strat-M membrane (25 mm in diameter, Merck Millipore) were carried out on the Copley diffusion analyzer (UK). Quantitative determination of Galavit® was performed by spectrophotometry (UV-2600 Shimadzu, Japan) in the wavelength range 294–298 nm in model media.

Results and discussion. The characteristic parameters of emulsion compositions were determined during the study: the particle size varied from 0.1 to 2 µm, the delamination time – from 9 to 95 min depending on the composition. The maximum yield of the drug from the TTS was 30 % through the membrane.

Conclusion. The possibility of transdermal transfer of Galavit® from TTS is shown in model experiments.

Keywords: transdermal therapeutic system, immunomodulator, emulsion, particle size, Strat-M membranes, drug diffusion.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors of articles Evgeniya G. Kuznetsova and Lidia A. Salomatina were engaged in the development of the experiment. Evgeniya G. Kuznetsova, Lidia A. Salomatina and Olga M. Kuryleva performed the entire experimental part of the work. Evgeniya G. Kuznetsova, Olga M. Kuryleva, Lidia A. Salomatina, Viktor I. Sevastianov participated in the writing of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M., Salomatina L. A., Sevastianov V. I. Experimental investigation of immunomodulator Galavit® diffusion in a model system. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 92–97.

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицинской практике для лечения и профилактики заболеваний различных нозологических форм все чаще стали использоваться иммуномодуляторы (ИМ). Повышенный интерес к данной группе лекарственных средств способствует не только активному поиску и синтезу новых ИМ, но и разработке различных лекарственных форм (ЛФ) уже существующих.

В настоящее время номенклатура лекарственных препаратов иммуномодуляторов с учетом всех ЛФ и дозировок включает более 200 наименований [1]. Одним из перспективных российских препаратов этого класса является Галавит® – производное фталгидрида. Это синтетическое низкомолекулярное лекарственное вещество – аминоксидигидрофалазиндион натрия, обладающее помимо иммуномодулирующего, выраженным противовоспалительным свойством. На российском рынке Галавит® представлен в следующих лекарственных формах: таблетки подъязычные 25 мг, суппозитории ректальные 50 мг и 100 мг, порошок для приготовления раствора для внутримышечного введения 50 мг и 100 мг [2].

В отделе биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В. И. Шумакова» МЗ РФ была предпринята попытка создания еще одной лекарственной формы данного ИМ – трансдермальной терапевтической системы (ТТС), одним из преимуществ которой является простота и безопасность использования [3]. Такая ЛФ даст возможность применения данного препарата у различных групп пациентов, которые в силу ряда причин и/или противопоказаний не могут использовать уже существующие ЛФ Галавит®.

Первым этапом разработки ТТС является подбор вспомогательных веществ для эмульсионной композиции с лекарственным веществом и исследование его диффузии в модельных системах. Различными исследователями было показано, что результаты диффузии ЛВ через синтетическую мембрану Strat-M (Menc Millipore) хорошо коррелируют для многих лекарственных субстанций с результатами диффузии через кожу [4–6].

Следует отметить, что данный вид мембран используют для исследования аппликационных лекарственных форм и косметических продуктов в качестве альтернативы кожи животных или трупной кожи человека [4, 7]. Подобно коже мембраны Strat-M имеют сложное строение. На рисунке 1 представлены

фотографии кожи и синтетической мембраны в разрезе. Мембрана состоит из двух полимерных слоев. Верхний слой мембраны из полиэфирсульфона имитирует роговой слой кожи. Так же как и у кожи, он очень плотный, что является серьезным препятствием для диффузии лекарственных веществ. Второй слой мембраны из полиолефина имеет более рыхлую пористую структуру, подобно дерме.

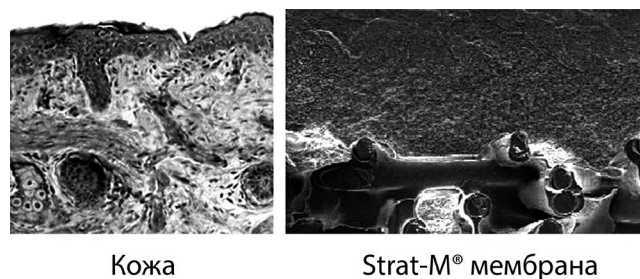


Рисунок 1. Фотография кожи (слева) и синтетической мембраны Strat-M (справа) в разрезе [7]

Figure 1. Sectional view of the skin (left) and the Strat-M synthetic membrane (right) [7]

Кожа содержит различные фосфолипиды и керамиды, которые придают ей гидрофобные свойства. Аналогично этому, пористая структура мембраны пропитана смесью синтетических липидов с вкраплениями белков, подобных белкам кожи. Общая толщина мембраны составляет приблизительно 300 мкм, что в среднем соответствует толщине кожного лоскута.

Использование мембран Strat-M позволяет унифицировать и стандартизировать условия проведения экспериментов по изучению чрескожной диффузии биологически активных веществ. В отличие от кожи, мембраны Strat-M не требуют специальной подготовки при исследовании диффузии ЛВ [4].

Целью данной работы является исследование *in vitro* диффузии ЛВ Галавит® из эмульсионных трансдермальных терапевтических систем через мембрану Strat-M.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Компоненты эмульсионных композиций

При разработке различных составов эмульсионных композиций для ТТС использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому при-

менению и отвечающие требованиям действующей нормативной документации.

Лекарственной субстанцией служил Галавит® в виде порошка для приготовления раствора для внутримышечного введения («СЭЛВИМ», Россия).

Для изготовления водной фазы эмульсии типа «вода в масле» применяли воду очищенную (ФС 42-2620-97, дистиллятор ДЭ-10 и фильтр «MILLIPORE SIMPAKOR®1») или 0,9 % раствор натрия хлорида (раствор для инфузий ОАО НПК «ЭСКОМ»). В водную среду для увеличения стабильности эмульсионных композиций (кроме состава № 2) добавляли додецилсульфат натрия (CAS № 151-21-3, AppliChem Panreac, Испания).

Основой масляной фазы эмульсионной композиции являлось масло абрикосовых ядер (CAS № 72869-69-3, Desert Whale Jojoba Company Ltd., США). Его использование обусловлено содержанием в нем ненасыщенных жирных кислот: линолевой (30–45 %) и олеиновой (55–70 %). При таком соотношении кислот масло хорошо впитывается в кожу и усиливает проникновение в роговой слой активных компонентов [8].

Активатором чрескожного переноса был выбран биологически безопасный детергент анионной природы – докузат натрия соль (ДНС) (D4422-50G, Sigma, США), обладающий амфифильными свойствами и широко используемый в фармацевтической промышленности. Ранее было показано, что присутствие в эмульсионной матрице докузат натрия соли в качестве переносчика ЛВ увеличивает скорость чрескожной диффузии [9]. Поэтому во всех исследуемых составах эмульсионных композиций с Галавит® содержался ДНС.

В качестве разрыхлителя кожи и антиоксиданта применяли альфа-токоферола ацетат (Customer Product #4904352421, BASF SE, Германия).

Во всех эмульсионных составах присутствовал эмульгатор NIKKOL Decaglyn PR-20 (CAS № 29894-35-7, Nikko Chemicals Co., Ltd., Япония) – эфир декаглицерина и полимеров рецинолевой кислоты. Это липофильное поверхностно-активное вещество (гидрофильно-липофильный баланс 3.2) имеет прекрасную эмульгирующую способность для эмульсий обратного типа W/O даже в присутствии неорганических солей. Кроме того, эмульгатор NIKKOL Decaglyn PR-20 допускает «холодное приготовление», что упрощает технологию изготовления эмульсий, и биологически безопасен при косметическом применении, а значит и при трансдермальной аппликации.

Добавление растительного ланолина (Aroma-Zone, Франция), созданного на основе масла семян клещевины и неомыляемой фракции масла оливы, в масляную фазу некоторых составов эмульсии обусловлено его положительными свойствами. Растительный ланолин имеет вязкую жидкую форму, что позволяет вводить его без нагрева в рецептуры, сделанные «холодным» способом; легко проникает в кожу; выступает в качестве носителя для доставки активных веществ в глубокие слои кожи; отличный эмомент.

В одном из составов в качестве загустителя использовали цетиловый спирт (CAS № 111-90-0, Sigma Aldrich, США) (пальмитиновый спирт) — одноатомный жирный спирт, обладающий слабым эмульгирующим свойством. Он часто встречается в косметических средствах как со-эмульгатор. Считается, что цетиловый спирт улучшает проницаемость липидного барьера для активных компонентов эмульсий.

Было разработано шесть эмульсионных композиций с ЛВ Галавит® различного состава. Компоненты, входящие в состав эмульсий представлены в таблице 1.

Таблица 1. Состав эмульсионных композиций

Table 1. The composition of the emulsion compositions

Компоненты эмульсионной композиции		Номер эмульсионной композиции					
		1	2	3	4	5	6
Водная фаза	Галавит®	+	+	+	+	+	+
	Вода	+					
	Физиологический раствор		+	+	+	+	+
	Додецилсульфат натрия	+		+	+	+	+
Масляная фаза	Масло абрикосовых ядер	+	+	+	+	+	+
	α-токоферола ацетат	+	+	+	+	+	+
	ДНС	+	+	+	+	+	+
	Decaglyn PR-20	+	+	+	+	+	+
	Ланолин		+	+	+		
	Цетиловый спирт			+		+	

Изготовление лабораторных образцов ТТС Галавит®

Для изготовления лабораторных образцов эмульсионных ТТС Галавит® необходимую навеску додецилсульфата натрия (весы аналитические GH-200 AND, Япония) растворяли в дистиллированной воде или физиологическом растворе, либо использовали чистый физиологический раствор, как в случае эмульсионного состава № 2. Точную навеску ЛВ растворяли в получившемся растворе. В отдельном флаконе масляный раствор α-токоферола ацетата с заранее растворенным в нем докузатом натрия соединяли с ланолином или цетиловым спиртом, а также с эмульгатором Decaglyn PR-20 и нагревали до 60 °С в течение 10 минут при постоянном перемешивании при 400 об/мин (мешалка магнитная с нагревом IKA, Германия). Затем в масляную фазу эмульсии по каплям добавляли водную фазу и перемешивали 2 минуты при помощи погружного диспергатора (T18 basic Ultra-Turrax IKA-WERKE GmbH&Co.Kg, Германия). Далее раствор подвергали воздействию ультразвукового гомогенизатора (UIS250V Heilscher, Германия) в течение 5 минут (amplitude 70, cycle 0,5).

Полученную эмульсионную композицию наносили на сорбирующую основу (ПАЛВ-01, ООО «Группа Компаний Пальма») площадью 1 см² в количестве 0,1 г. Таким образом, одна трансдермальная система содержала 4,6 мг ЛВ.

Методы исследования эмульсионных композиций

Подтверждение типа эмульсии «вода в масле» проводили методом окрашивания. Для испытания каплю эмульсии наносили на предметное стекло. На поверхность каждой пробы помещали несколько кристаллов порошка водорастворимого красителя генциан виолет (кристаллический фиолетовый, Химмед) [10]. Микрофотографии эмульсионных композиций с Галавит® для ТТС были сделаны на люминесцентном инвертированном микроскопе TS-100 (Nikon, Япония), оснащённым цифровой фотокамерой Digital Sight DS-Vi1 (Nikon, Япония).

Определение времени расслоения и размеров частиц эмульсионных композиций с Галавит® проводили при исследовании седimentации при центрифугировании образца на анализаторе дисперсий LUMiSizer (LUM, Германия) в инфракрасном свете (865 нм) при 25 °С. Профили прохождения света записывали каждые 600 секунд при скорости вращения ротора 4000 об/мин, световой фактор был выбран равным 3.

Исследование диффузии через мембраны in vitro

Динамику выхода Галавит® из ТТС изучали в стеклянных диффузионных ячейках Франца. Мембрану Strat-M 25 мм в диаметре, на которую сверху помещали ТТС Галавит® площадью 1 см², фиксировали между фланцами донорской и приемной камер диффузионной ячейки. Приемную камеру заполняли 0,9 % водным раствором натрия хлорида. Ячейку помещали в анализатор диффузии препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания), где термостатировали её при температуре 32 °С при постоянном перемешивании 400 об/мин. Отбор проб производили из стеклянного патрубка приемной камеры с последующей регистрацией максимума спектра поглощения галавита на спектрофотометре UV-2600 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 294–298 нм.

В каждом эксперименте исследовали 5 образцов ТТС одного состава. Для каждого состава ТТС было проведено по 3 эксперимента.

В качестве отрицательного контроля использовали раствор из приемной камеры диффузионной ячейки при аппликации плацебо на мембрану. Тот же раствор с добавлением известного количества ЛВ использовали как положительный контроль.

Концентрацию раствора лекарственного вещества (С) в приемной камере диффузионной ячейки определяли по формуле (1):

$$C = \frac{A \cdot C_k}{A_k}, \quad (1)$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора; С_к – концентрация калибровочного раствора ЛВ Галавит®, 10 мкг/мл; А_к – оптическая плотность калибровочного раствора, 0,311.

Далее рассчитывали количество ЛВ Галавит® (Х) перешедшего в раствор по формуле (2):

$$X = \frac{C \cdot V}{1000}, \quad (2)$$

где С – концентрация ЛВ Галавит®, мкг/мл; V – объем образца, мл; 1000 – фактор пересчета, мг/мкг.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании эмульсионных композиций добавление водорастворимого красителя привело к окрашиванию в фиолетовый цвет дисперсной фазы, что подтверждает тип эмульсии «вода в масле». В качестве примера на рисунке 2 представлена микрофотография эмульсии с составом № 1.



Рисунок 2. Микрофотография эмульсионной композиции № 1, ув. x10

Figure 2. Micrograph of emulsion composition No. 1, uv. x10

Стабильность исследуемых эмульсионных композиций оценивали методом седimentации при центрифугировании на анализаторе дисперсий. Профили пропускания света, прошедшего через образцы, как функция от времени и положения относительно длины пробирки, иллюстрируют процесс расслоения эмульсий с составом № 1 и 2 (рисунок 3).

Таблица 2. Время расслоения и размер частиц эмульсионных композиций

Table 2. The time of separation and particle size of the emulsion compositions

Номер эмульсионной композиции	1	2	3	4	5	6
Время расслоения, мин.	90–95	40–44	9–10	18–19	22–24	42–44
Размер частиц, мкм	0,1–1,0	0,1–1,2	0,5–2,0	0,3–1,0	0,2–2,0	0,1–2,0
Медиана, мкм	0,39	0,52	0,57	0,40	0,56	0,58

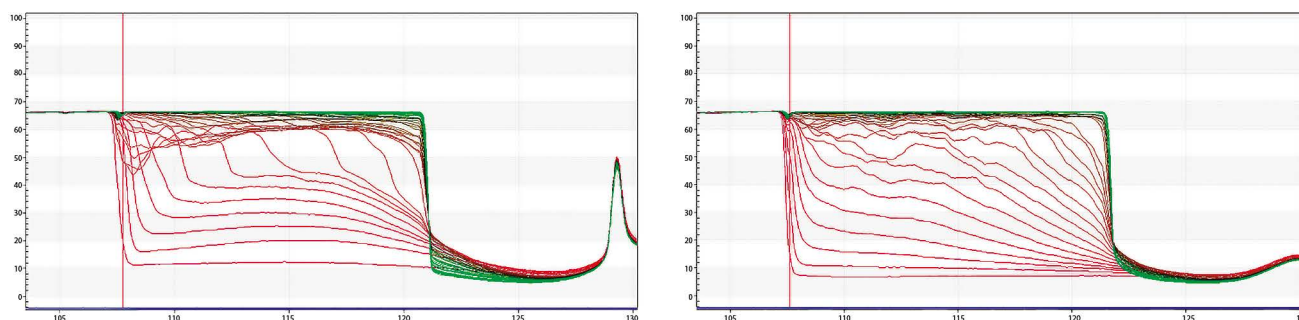


Рисунок 3. Профили процесса расслоения эмульсионных композиций № 1 (слева) и 2 (справа)

Figure 3. The profiles of the process of separation of emulsion compositions No. 1 (left) and 2 (right)

Результаты исследования размеров частиц и времени расслоения эмульсионных композиций шести составов, содержащих различные растворители, эмульгаторы, активаторы чрескожного переноса, представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, самое большое время расслоения при одинаковых условиях проведения исследований у эмульсионного состава № 1 (90–95 минут). При этом размер частиц данной эмульсионной композиции варьируется от 0,1 до 1,0 мкм, что является наименьшим значением по сравнению с другими составами. К тому же эмульсия с составом № 1 имеет наименьшую величину медианы. Эмульсия № 4 наиболее близкая к эмульсии № 1 по размеру частиц, но менее устойчивая. Её время расслоения составляет 18–19 минут.

Эмульсии с составами № 2 и 6 схожи по времени расслоения, которое составляет около 43 минут. Но в эмульсии состава № 6 присутствуют частицы большего размера.

Эмульсионная композиция № 5 оказалась менее устойчивой по сравнению с эмульсией № 6, хотя по размеру частиц они практически совпадают.

Самая неустойчивая эмульсионная композиция № 3 имеет время расслоения около 10 минут. Это, вероятно, обусловлено наличием в составе эмульсии более крупных частиц.

Диффузия ЛВ Галавит® из TTC *in vitro* через мембраны Strat-M

Для исследования диффузии через мембраны *in vitro* использовали лабораторные образцы TTC Галавит® площадью 1 см², содержащие по 4,6 мг лекарственной субстанции.

В таблице 3 представлены результаты исследования диффузии Галавит® из эмульсионных TTC через мембраны Strat-M за 24 часа аппликации.

Как видно из таблицы из TTC Галавит® с составами № 1 и 2 в приемные камеры диффузионных ячеек через мембрану прошло примерно 30 % лекарственного вещества от заложенного. Данный результат является хорошим показателем выхода ЛВ для трансдермальных терапевтических систем. При исследовании других составов результат диффузии составил от 8 % до 20 %.

На рисунке 4 представлены графики зависимости количества лекарственного вещества, прошедшего через мембрану Strat-M из TTC с эмульсионными композициями № 1 и 2, от времени.

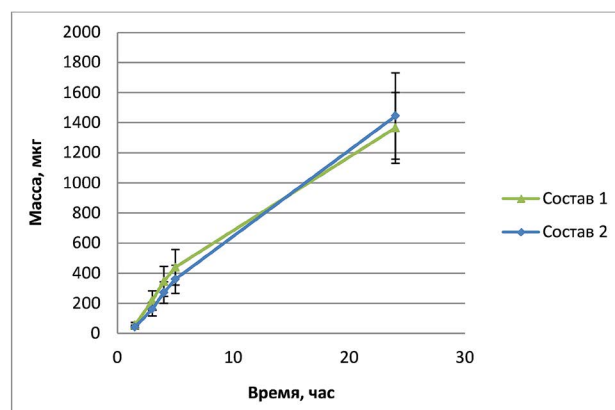


Рисунок 4. Диффузия ЛВ Галавит® через мембрану Strat-M из TTC

Figure 4. Diffusion of Galavit® drug through the Strat-M membrane from TTC

Таблица 3. Количественный выход ЛВ Галавит® из эмульсионных TTC (n = 15)

Table 3. Quantitative yield of drug Galavit® from emulsion TTC (n = 15)

Номер эмульсионной композиции	1	2	3	4	5	6
Масса ЛВ Галавит®, мг	1,37	1,43	0,9	0,4	0,6	0,9
Кол-во ЛВ Галавит® с контактной площади, %	29,8 ± 7,1	31,0 ± 5,6	19,0 ± 4,0	8,0 ± 2,1	14,0 ± 3,7	20,0 ± 5,2

Как видно из рисунка, скорость диффузии лекарственного вещества на протяжении 24 часов остается постоянной как для первого, так и для второго состава ТТС Галавит® и составляет в среднем $58 \text{ мкг/см}^2 \cdot \text{ч}$, что соответствует скорости диффузии лекарственных веществ близкой молекулярной массы (кофеин, ацетилсалициловая кислота) через мембрану Strat-M [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы разработаны и исследованы *in vitro* лабораторные образцы эмульсионной трансдермальной терапевтической системы Галавит® с различным составом.

Проведенные исследования показали принципиальную возможность трансдермального переноса ЛВ Галавит® в модельных системах через мембраны Strat-M (аналог кожи). Два из шести разработанных составов с лучшими характеристическими показателями, предполагается использовать для проведения дальнейших исследований на переживающей коже животного.

ЛИТЕРАТУРА

- Орел А. А. Обзор российского рынка иммуномодуляторов. *Смоленский медицинский альманах*. 2016: 174–177.
- Государственный реестр лекарственных средств 2019 г.
- Torin Huzil J., Sivaloganathan S., Kohande M., Foldvari M. Drug delivery through the skin: molecular simulations of barrier lipids to design more effective noninvasive dermal and transdermal delivery systems for small molecules, biologics, and cosmetics. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011; 3 (5): 449–462. DOI: 10.1002/wnan.147.
- Joshi V. Substituting Strat-M membrane for human skin in evaluating effect of encapsulation on diffusion of sunscreen formulations. 2014. Available at: <http://www.merckmillipore.com/>
- Joshi V., Brewster D., Colanero P. *In vitro* diffusion studies in transdermal research: a synthetic membrane model in place of human skin. *Drug development and delivery*. 2012; 12(12): 40–42.
- Karadzovska D., Riviere J. E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 50(5): 569–576. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.02.020.
- Janani N. S., Kumar G. B., Balakrishna P., Sruthi D., Kumar M. S., Mantry S. A review of Strat-M membrane. *International journal of innovative pharmaceutical sciences and research*. 2014; 2(4): 962–977.
- Шепель В. С. О составлении смесей растительных масел для косметических композиций. Available at: http://www.tusheflora.ru/review/publications/2010/o_sostavlenii_smesej_rastitelnih_masel_dlya_kosmeticheskikh_kompozitsij/svobodnyj.
- Ryzhikova V. A., Tikhobayeva A. A., Salomatina L. A., Kursakov S. V., Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M., Sevastianov V. I. Effect of the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems. *Inorganic Materials: applied research*. 2014; 5(5): 498–503.
- Захарченко В. Н. Коллоидная химия. 2-е изд. М.: Высшая школа. 1989: 176–177.

REFERENCES

- Orel A.A. Overview of the Russian market of immunomodulators. *Smolensk medical almanac*. 2016: 174–177. (in Russ.).
- State Register of Medicines 2019. (in Russ.).

- Torin Huzil J., Sivaloganathan S., Kohande M., Foldvari M. Drug delivery through the skin: molecular simulations of barrier lipids to design more effective noninvasive dermal and transdermal delivery systems for small molecules, biologics, and cosmetics. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011; 3 (5): 449–462. DOI: 10.1002/wnan.147.
- Joshi V. Substituting Strat-M membrane for human skin in evaluating effect of encapsulation on diffusion of sunscreen formulations. 2014. Available at: <http://www.merckmillipore.com/>
- Joshi V., Brewster D., Colanero P. *In vitro* diffusion studies in transdermal research: a synthetic membrane model in place of human skin. *Drug development and delivery*. 2012; 12(12): 40–42.
- Karadzovska D., Riviere J. E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 50(5): 569–576. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.02.020.
- Janani N. S., Kumar G. B., Balakrishna P., Sruthi D., Kumar M. S., Mantry S. A review of Strat-M membrane. *International journal of innovative pharmaceutical sciences and research*. 2014; 2(4): 962–977.
- Shepel' V. S. About the preparation of mixtures of vegetable oils for cosmetic compositions. Available at: http://www.tusheflora.ru/review/publications/2010/o_sostavlenii_smesej_rastitelnih_masel_dlya_kosmeticheskikh_kompozitsij/svobodnyj (in Russ.).
- Ryzhikova V. A., Tikhobayeva A. A., Salomatina L. A., Kursakov S. V., Kuznetsova E. G., Kuryleva O. M., Sevastianov V. I. Effect of the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems. *Inorganic Materials: applied research*. 2014; 5(5): 498–503.
- Zaharchenko V. N. Colloid chemistry. 2nd ed. M.: Higher school. 1989: 176–177. (in Russ.).



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



<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-99-108>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС

Т. Н. Комаров^{1*}, И. Е. Шохин^{1,2}, О. А. Мискив¹, Д. С. Богданова¹, А. В. Алешина¹,
Ю. В. Медведев^{1,3}, Н. С. Багаева¹

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

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

*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Статья получена: 15.01.2020. Статья принята к печати: 21.02.2020

Резюме

Введение. ВИЧ-инфекция является одним из наиболее актуальных заболеваний современности с медицинской, эпидемиологической и социальной точки зрения. Своевременная диагностика, выявление и контроль заболевания, адекватное назначение антиретровирусной терапии позволяют в достаточной степени снизить вирусную нагрузку на организм пациента, снизить риски передачи инфекции. В настоящее время в качестве терапии всё чаще назначаются комбинации различных антиретровирусных лекарственных средств. Одной из перспективных комбинаций является совместное применение атазанавира и ритонавира. Важнейшим этапом для изучения фармакокинетического взаимодействия, исследований сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности является разработка аналитической методики, позволяющей определять исследуемые вещества в плазме крови человека. В настоящее время нет опубликованных методик о совместном определении атазанавира и ритонавира в плазме крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием с применением одноквадрупольного масс-детектора. В данной работе приведена разработка и валидация методики совместного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови после пробоподготовки способом осаждения белков.

Цель. Целью исследования является разработка методики количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с одноквадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) для проведения аналитической части фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Количественное определение атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,0–10000,0 нг/мл для атазанавира и 10,0–2500,0 нг/мл для ритонавира. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих атазанавир и ритонавир.

Ключевые слова: атазанавир, ритонавир, плазма, ВЭЖХ-МС, определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, Д. С. Богданова, О. А. Мискив, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку полученных результатов. И. Е. Шохин и Ю. В. Медведев отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 99–108.

Development and Validation of Atazanavir and Ritonavir Determination in Human Plasma by HPLC-MS Method

Timofey N. Komarov^{1*}, Igor E. Shohin^{1,2}, Olga A. Miskiv¹, Dana S. Bogdanova¹, Alexandra V. Aleshina¹,
Yuri V. Medvedev^{1,3}, Natalia S. Bagayeva¹

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

3 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Timofey N. Komarov. E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Received: 15.01.2020. Accepted: 21.02.2020

Abstract

Introduction. HIV infection is one of the most relevant diseases from a medical, epidemiological and social point of view. Timely diagnosis, detection and control of the disease, adequate prescription of antiretroviral therapy can sufficiently reduce the viral load on the patient's body, reduce the risk of transmission of infection. Currently, combinations of various antiretroviral drugs are increasingly being prescribed as therapy. One of the most important is combination of atazanavir and ritonavir. The most important stage for the study of pharmacokinetics, studies of comparative pharmacokinetics and bioequivalence is the development of an analytical method that allows you to determine the investigated substances in human plasma. There are currently no published methods for the determination of atazanavir and ritonavir in human plasma using high performance liquid

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С., 2020

© Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagayeva N. S., 2020

chromatography with mass selective detection using a single quadrupole mass detector. In this article presents the development and validation of a method for the determination of atazanavir and ritonavir in blood plasma after sample preparation by the method of protein precipitation.

Aim. The aim of the study is to develop a method for the quantitative determination of atazanavir and ritonavir in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection for performing the analytical part of pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of atazanavir and ritonavir in human plasma by HPLC with mass spectrometric detection. A sample was prepared using protein deposition.

Results and discussion. The method was validated of selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, limit of quantification, carry-over effect and sample stability.

Conclusion. The method of the determination of atazanavir and ritonavir in human plasma was developed and validated by HPLC-MS. The analytical range of the was 50.0–10000.0 ng/mL in plasma for atazanavir and 10.0–2500.0 ng/mL in plasma for ritonavir. Method could be applied to determination of atazanavir and ritonavir in plasma for PK and BE studies.

Keywords: atazanavir, ritonavir, plasma, HPLC-MS, determination, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Dana S. Bogdanova, Olga A. Miskiv, Alexandra V. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin and Yuri V. Medvedev carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and validation of atazanavir and ritonavir determination in human plasma by HPLC-MS method. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 99–108.

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция остаётся одним из наиболее распространённых инфекционных заболеваний современности и наиболее важной и сложной проблемой здравоохранения в силу своей социальной, медицинской и демографической значимости [1]. В связи с тем, что распространение ВИЧ в мире растёт с каждым годом, основной путь в борьбе с этим заболеванием должен быть направлен на профилактические мероприятия [2]. Вместе с тем своевременное назначение антиретровирусной терапии (АРВТ) у лиц с подтверждённым ВИЧ-положительным снижает частоту развития оппортунистических инфекций и смертность среди ВИЧ-инфицированных [3, 4].

Атазанавир – антиретровирусный препарат, активный против ВИЧ-1, относящийся к группе ингибиторов протеазы (ИП) ВИЧ. Протеаза ВИЧ представляет собой фермент, осуществляющий протеолитическое расщепление полипротеиновых предшественников вируса на отдельные белки, входящие в состав ВИЧ. Подавление этого фермента нарушает образование белков вирусного капсида и созревание вируса, что приводит к формированию незрелых вирусных частиц, неспособных инфицировать другие клетки. По антиретровирусной активности *in vitro* атазанавир превосходит другие ИП – ампренавир, индинавир, нелфинавир, ритонавир и саквинавир. Отличительными фармакокинетическими особенностями атазанавира являются высокая биодоступность и возможность однократного приема в сутки. Равновесная концентрация препарата достигается примерно через 6 дней лечения. При приеме атазанавира совместно с низкими дозами (100 мг в сутки) ритонавира (так называемый «усиленный», или бустированный режим) отмечается повышение концентрации атазанавира в плазме крови [5].

Атазанавир является слабым ингибитором CYP3A [6]. Было обнаружено, что атазанавир подвергается пяти различным «биотрансформационным» фазам через микросомальные инкубации печени человека (рисунок 1). Эти пять путей продуцировали 16 метаболитов, включая:

- 1) моноокисление (M1-M4);
- 2) окислительное декарбоксилирование (M5-M6);
- 3) окислительную дегидратацию (M7-M8);
- 4) моноокисление и окислительное декарбоксилирование (M9-M12);
- 5) окисление (M13-M16).

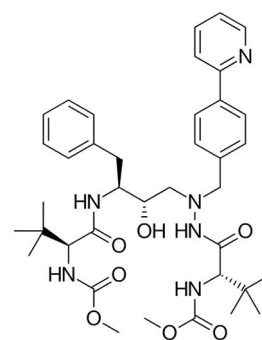


Рисунок 1. Структурная формула атазанавира

Figure 1. The structural formula of atazanavir

Было идентифицировано шесть преобладающих метаболитов, наиболее распространенными являются метаболиты моноокисления M2 и M1 [6].

Наблюдались заметные различия между CYP3A4 и CYP3A5. Наиболее важно, что CYP3A5 продуцировал основные метаболиты моноокисления M1 и M2 со зна-

чительно более быстрыми темпами, чем СYP3A4: в 32 раза быстрее для M1 и в 2,6 раза быстрее для M2 [7]. Поскольку атазанавир метаболизируется в печени при участии изофермента СYP3A4, при одновременном применении с другими препаратами, метаболизирующимися данным изоферментом (в том числе блокаторами кальциевых каналов, ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы и ингибиторами ФДЭ-5, включая силденафил, тадалафил, варденафил) возможно повышение концентрации в плазме крови одного из компонентов. Это может привести к усилению и пролонгированию терапевтического и побочного действия ингибитора ФДЭ 5 [8].

Ритонавир представляет собой ингибитор аспартил-протеаз ВИЧ-1 и ВИЧ-2 для приема внутрь, активный пептидомиметик. Ритонавир ингибирует протеазу ВИЧ, которая расщепляет структурные и репликативные белки, возникающие из основных генов ВИЧ, таких как gag и pol. Gag кодирует белки, участвующие в ядре и нуклеокапсиде, тогда как pol кодирует обратную транскриптазу ВИЧ, рибонуклеазу H, интегразу и протеазу. Pol-кодированные белки первоначально переводятся в виде более крупного прекурсового полипептида, gag-pol, и его необходимо расщепить протеазой ВИЧ с образованием других комплементарных белков. Ритонавир предотвращает расщепление полипротеина gag-pol, что приводит к неинфекционным, незрелым вирусным частицам [9].

Исследования *in vitro* также продемонстрировали, что атазанавир является одновременно ингибитором и индуктором РР-гликопротеинового АТФ-зависимого оттока, который обладает широким клеточным распределением и широкой субстратной специфичностью, что еще больше увеличивает его потенциал для взаимодействия лекарственных средств и переменных фармакокинетик *in vivo* [10]. Поэтому Атазанавир следует использовать с осторожностью у пациентов, принимающих сильные ингибиторы СYP3A4, умеренные или сильные индукторы СYP3A4 и основные субстраты СYP3A4. При одновременном применении атазанавира с ингибиторами изофермента СYP3A4 возможно повышение концентрации атазанавира в плазме крови [8].

Применение атазанавира у здоровых добровольцев в дозе 300 мг совместно с ритонавиром ведет к увеличению C_{max} в 1,86, а AUC – в 3,38 раза по сравнению с данными параметрами при назначении 400 мг одного АТВ. Это клинически значимое лекарственное взаимодействие обусловлено ингибированием ритонавиром СYP3A, в результате чего замедляется метаболизм АТВ. Именно этим обусловлена перспективность создания и терапевтического применения комбинированной лекарственной формы атазанавира и ритонавира. Неотъемлемой частью разработки комбинированного лекарственного средства является изучение его фармакокинетики.

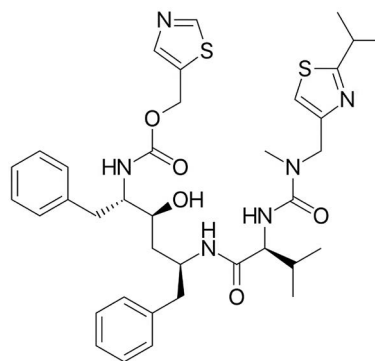


Рисунок 2. Структурная формула ритонавира

Figure 2. The structural formula of ritonavir

Для количественного определения атазанавира и комбинированного препарата атазанавира с ритонавиром в биологических объектах при проведении клинических и доклинических исследований на сегодняшний момент, исходя из их физико-химических свойств, использовались такие методики определения, как высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной экстракции (ТФЭ) [11, 12], и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС/МС) в сочетании с пробоподготовкой твердофазной и жидкостной экстракции (ЖЖЭ) [13–15]. Данные методик приведены в таблице 1.

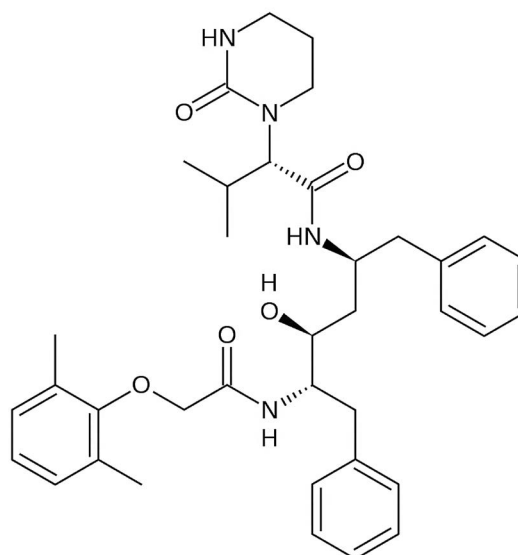


Рисунок 3. Структурная формула ритонавира

Figure 3. The structural formula of ritonavir

Как показал анализ литературы в настоящее время нет опубликованных данных по совместному определению атазанавира и ритонавира в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС с одноквадрольным

детектированием с целью применения для исследования фармакокинетики атазанавира и ритонавира, применяемых в составе комбинированных лекарственных форм.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения атазанавира и ритонавира

Table 1. Bioanalytical methods of quantitative determination of atazanavir and ritonavir

Аналитический метод	Пробоподготовка	Аналитический диапазон, нг/мл	Ссылка
Атазанавир			
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	156,0–1000,0	[11]
ВЭЖХ-УФ	ТФЭ	20,0–10000,0	[12]
ВЭЖХ-УФ	ЖЖЭ	10,0–4000,0	[13]
Ритонавир			
ВЭЖХ-МС/МС	ТФЭ	2,0–2280,0	[14]
Атазанавир и ритонавир			
ВЭЖХ-МС/МС	ЖЖЭ	5,0–500,0 и 1,0–500,0 соотв.	[15]

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при помощи одноквадрупольного масс-детектора (ВЭЖХ-МС). В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II с масс-селективным детектором 6125, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (LC-MS grade, Biosolve, Израиль); муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы субстанции атазанавира сульфат (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich), ритонавир (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich), прометазина гидрохлорид (содержание 99,9 %, Sigma Aldrich).

Исходные стандартные растворы атазанавира, ритонавира и прометазина (внутренний стандарт) готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, промежуточные и рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходные стандартные растворы, промежуточные и рабочие растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 300 мкл калибровочного образца (либо к 300 мкл интактной плазмы крови для приготовления бланка, либо к 300 мкл образца плазмы крови добровольца), помещённым в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляют 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта прометазина (5000,00 нг/мл), затем прибавляют 900 мкл ацетонитрила, перемешивают на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугируют в течение 15 мин со скоростью 13 500 об/мин. Далее 1000 мкл супернатанта переносят в хроматографические виалы и помещают в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. The concentrations of analytes at each calibration level

Уровень	Концентрация аналита, нг/мл		Концентрация внутреннего стандарта, мл
	Атазанавир	Ритонавир	Прометазин
1	50,0	10,0	500,0
2	100,0	25,0	500,0
3	250,0	50,0	500,0
4	500,0	100,0	500,0
5	1000,0	250,0	500,0
6	2500,0	500,0	500,0
7	5000,0	1000,0	500,0
8	10000,0	2500,0	500,0

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Phenomenex Luna C18, 50 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °С.
- Подвижная фаза: элюент А – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q (по объёму); элюент В – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00	83	17	1,00
0,50	83	17	
2,90	35	65	
3,80	0	100	
5,00	0	100	
5,10	83	17	
6,50	83	17	

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0–6,5 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 250 кПа, осушающий газ 13 л/мин, температура источника ионизации 350 °С, напряжение на капилляре +3 кВ.
- Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме SIM (Single Ion Monitoring). Условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Условия масс-спектрометрического детектирования исследуемых веществ

Table 4. The conditions of mass-spectrometric detection of the investigated substances

Исследуемое вещество	Исследуемый ион (m/z)	Режим ионизации
Атазанавир	705,8	+
Ритонавир	721,6	+
Прометазин	285,2	+

- Время удерживания атазанавира: около 3,10 мин.
- Время удерживания ритонавира: около 3,75 мин.
- Время удерживания прометазина: около 2,28 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств том I [9], а также руководств FDA [10] и ЕМА [11] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов аналита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников и образцов интактной плазмы крови с прибавлением смешанных рабочих стандартных растворов атазанавира и ритонавира, а также раствора внутреннего стандарта до концентраций, указанных в таблице 2. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови не

наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующими временам удерживания атазанавира, ритонавира и прометазина. Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 4 и 5.

Эффект матрицы

Было оценено влияние биологической матрицы на количественное определение атазанавира в комбинации с ритонавиром в плазме крови человека. Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов атазанавира, ритонавира и раствора внутреннего стандарта прометазина без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме крови без учёта влияния степени извлечения атазанавира, ритонавира и прометазина. Эффект матрицы был оценен на низком и верхнем уровнях аналитического диапазона концентраций атазанавира (100,0 нг/мл и 10000,0 нг/мл) и ритонавира (25,0 нг/мл и 2500 нг/мл). Данные представлены в таблице 5. Для внутреннего стандарта (прометазин) эффект матрицы был рассчитан на уровне 500,0 нг/мл.

Фактор матрицы рассчитывался как отношение значения площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного на плазме после осаждения белков (учитывает влияние биологической матрицы, но не учитывает степень извлечения) к значению площади пика аналита на хроматограмме образца, приготовленного без влияния биологической матрицы.

Фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, рассчитывали как отношение значения фактора матрицы атазанавира к фактору матрицы прометазина (внутренний стандарт). Коэффициент вариации (CV, %) фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, не должен превышать 15 %.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора внутреннего стандарта и смешанных рабочих стандартных растворов до получения концентраций анализируемых веществ и внутреннего стандарта, указанных в таблице 2, соответствующих каждому калибровочному уровню. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта от отношения концентрации аналита к концентрации внутреннего стандарта в плазме крови. Графики приведены на рисунках 6 и 7.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений, приведены в таблице 6.

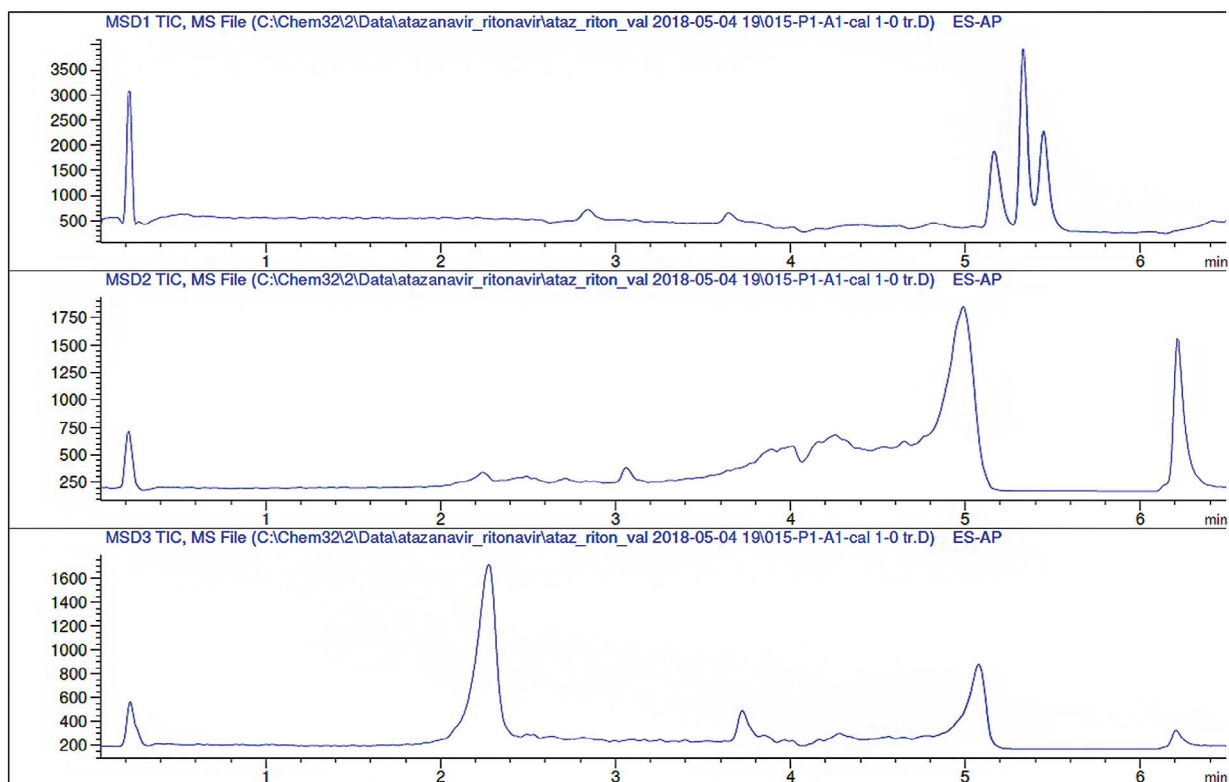


Рисунок 4. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 4. Chromatogram of a blank plasma sample

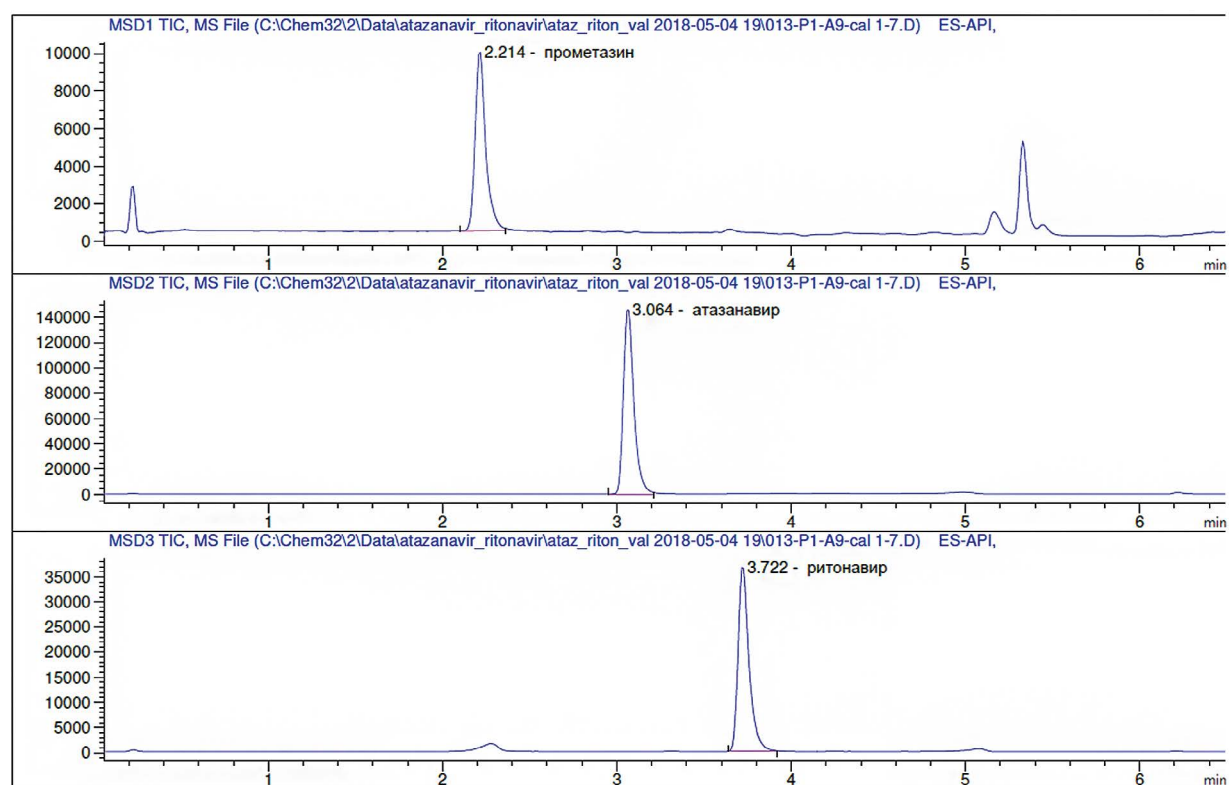


Рисунок 5. Хроматограмма калибровочного образца плазмы крови, уровень № 7 (таблица № 2)

Figure 5. Chromatogram of calibration sample, level № 7 (table № 2)

Таблица 5. Расчёт фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта

Table 5. Calculation of the matrix factor of the analyzed substances, normalized by the matrix factor of internal standards

№	Mf атазанавира (100,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf	№	Mf атазанавира (10000,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf
1	1,18	1,00	1,18	1	0,99	1,01	0,98
2	1,15	1,03	1,12	2	1,00	1,01	0,99
3	1,13	1,01	1,12	3	1,00	1,01	0,99
4	1,14	1,03	1,11	4	1,00	1,01	0,98
5	1,14	1,02	1,11	5	0,99	1,02	0,97
6	1,12	1,02	1,00	6	0,99	1,04	0,95
Среднее			1,12	Среднее			0,98
CV, %			2,70	CV, %			1,41
№	Mf ритонавира (25,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf	№	Mf ритонавира (2500,0 нг/мл)	Mf прометазина (500,0 нг/мл)	Нормализованный Mf
1	1,52	1,00	1,53	1	1,30	1,01	1,29
2	1,54	1,03	1,50	2	1,30	1,01	1,29
3	1,54	1,01	1,52	3	1,33	1,01	1,31
4	1,48	1,03	1,44	4	1,31	1,01	1,29
5	1,57	1,02	1,54	5	1,33	1,02	1,30
6	1,48	1,02	1,45	6	1,32	1,04	1,28
Среднее			1,49	Среднее			1,29
CV, %			2,77	CV, %			0,95

Таблица 6. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений, калибровочный график № 1

Table 6. Deviations of analyte concentrations in calibration samples from their nominal values, calibration chart № 1

Концентрация атазанавира номинальная, нг/мл	Концентрация атазанавира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %	Концентрация ритонавира номинальная, нг/мл	Концентрация ритонавира рассчитанная, нг/мл	E, %	Норма не более, %
50,0	52,2	4,3	20	10,0	10,3	3,0	20
100,0	103,0	3,0	15	25,0	27,2	8,8	15
250,0	243,4	-2,7	15	50,0	51,9	3,8	15
500,0	483,6	-3,3	15	100,0	102,1	2,1	15
1000,0	1043,0	4,3	15	250,0	251,3	0,5	15
2500,0	2643,8	5,8	15	500,0	511,36	2,3	15
5000,0	4982,9	-0,3	15	1000,0	954,69	-4,5	15
10000,0	9812,6	-1,87	15	2500,0	2479,7	-0,81	15

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО (см. таблицу 2, № 1), низкий уровень (см. таблицу 2, № 2), средний уровень (см. таблицу 2, № 7), верхний уровень (см. таблицу 2, № 8). Анализ валидационных образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точности и прецизионности были оценены внутри цикла (последовательность 1), между двумя циклами (последовательности 1 и 2), между тремя циклами (последовательности 1, 2, 3). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (E, %), приведенные в таблице 7.

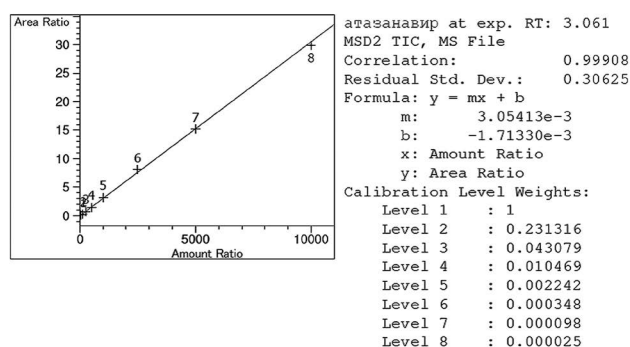


Рисунок 6. Калибровочный график зависимости отношения площади пика атазанавира к площади пика прометазина от отношения концентрации атазанавира к концентрации прометазина плазме крови

Figure 6. The calibration curve dependence of the ratio area peak of atazanavir to the promethazine on the concentration ratio of atazanavir to the promethazine in plasma

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Нижний предел количественного определения, предел обнаружения

Нижний предел количественного определения (НПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация веществ в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение веществ со значениями RSD и E не более 20 %.

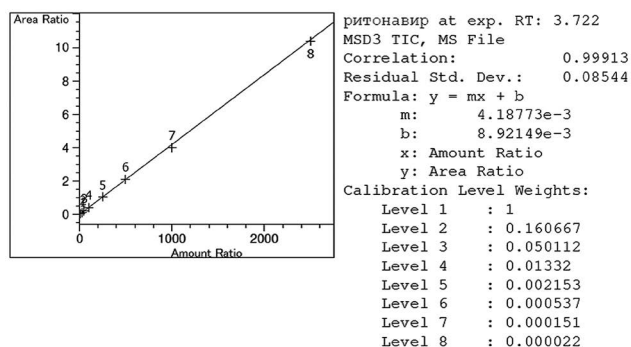


Рисунок 7. Калибровочный график зависимости отношения площади пика ритонавира к площади пика прометазина от отношения концентрации ритонавира к концентрации прометазина в плазме крови

Figure 7. The calibration curve dependence of the ratio area peak of ritonavir to the promethazine on the concentration ratio of ritonavir to the promethazine in plasma

Нижний предел количественного определения методики атазанавира и ритонавира составил 50,0 нг/мл и 10,0 нг/мл соответственно. Хроматограмма плазмы крови с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО приведена на рисунке 8.

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность (для приготовленных проб в течение рабочего дня), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность для стандартных растворов (при хранении в течение 42 дней при температуре -45°C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 42 дней при температуре -45°C) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочных образцов и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсут-

вовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемых веществ и внутреннего стандарта с площадью более чем 20 % от уровня НПКО. Перенос пробы отсутствовал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения атазанавира и ритонавира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,0–10000,0 нг/мл в плазме крови для атазанавира, 10,0–2500,0 нг/мл в плазме крови для ритонавира. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов, содержащих атазанавир и ритонавир.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцева Н. Н., Ефимов Е. И., Солнцев Л. А. Электронный атлас в эпидемиологическом надзоре за ВИЧ-инфекцией. *Медицинский альманах*. 2014; 4(34): 63–67.
2. Эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции в России. Available at: <http://www.cgemo.ru/doks/news/epid-vich-2017.pdf>.
3. Олейник А. Ф., Фазылов В. Х. Антиретровирусная терапия как метод профилактики ВИЧ-инфекции. *Инфекционные болезни: новости, мнение, обучение*. 2016; 3(6): 113–117.
4. Severe P., Juste M. A. J., Ambroise A., Eliacin L., Marchand C., Apollon S., Edwards A., Bang H., Nicotera J., Godfrey C., Gulick R. M., Johnson W. D., Pape J. W., Fitzgerald D. W. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *New England Journal of Medicine*. 2010; 3(363): 257–265. DOI: 10.1056/NEJMoa0910370.
5. Кравченко А. В. Безопасность и эффективность применения атазанавира в составе современных схем АРВТ. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2010; 17: 220–235.
6. Guaraldi G., Cocchi S., Motta A., Ciaffi S., Codeluppi M., Bonora S., Benedetto F. D., Masetti M., Floridia M., Baroncelli S., Pinetti D., D'Avolio A., Bertolini A., Esposito R. A pilot study on the efficacy, pharmacokinetics and safety of atazanavir in patients with end-stage liver disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 6(62): 1356–1364. DOI: 10.1093/jac/dkn383.

Таблица 7. Точность и прецизионность методики определения атазанавира и ритонавира (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Table 7. Accuracy and precision of atazanavir and ritonavir determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение			SD			RSD, %			E, %		
	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)	(n = 5)	(n = 10)	(n = 15)
Атазанавир												
50,0	51,5	51,2	51,2	0,7	0,9	0,8	1,4	1,7	1,6	3,1	2,4	2,4
100,0	98,6	98,1	98,3	1,3	1,2	1,1	1,3	1,2	1,1	–1,5	–1,9	–1,7
5000,0	4804,9	4886,1	4912,0	54,8	96,9	53,6	1,1	2,0	1,1	–3,9	–2,3	–1,8
10000,0	9722,7	9810,4	9864,5	43,4	120,9	49,2	0,5	1,2	0,5	–2,8	–1,9	–1,3
Ритонавир												
10,0	10,5	10,2	10,0	0,7	0,6	0,4	6,8	5,4	4,4	4,9	2,4	0,4
25,0	26,8	26,3	26,5	0,5	0,7	1,7	1,9	2,6	5,1	7,8	5,1	6,1
1000,0	936,9	944,7	949,6	21,3	21,2	24,1	2,3	2,3	2,5	–6,3	–5,5	–5,0
2500,0	2495,2	2507,9	2506,8	18,1	30,3	23,4	0,7	1,2	0,9	–0,2	0,3	0,3

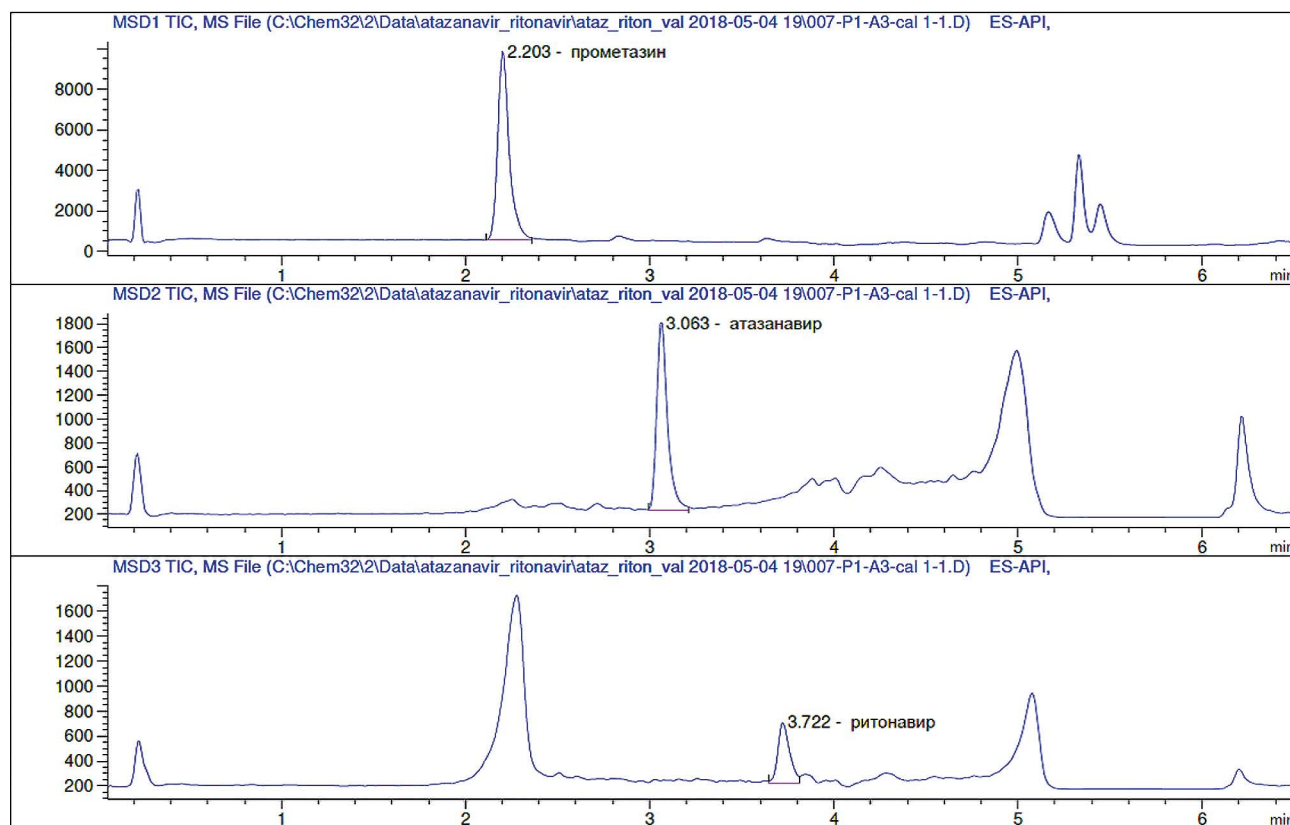


Рисунок 8. Хроматограмма образца с содержанием исследуемых веществ на уровне НПКО

Figure 8. Chromatogram of the sample with the content of the studied substances at the LLOQ level

- Wempe M. F., Anderson P. L. Atazanavir metabolism according to CYP3A5 status: an in vitro-in vivo assessment. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011; 3(39): 522–527. DOI: 10.1124/dmd.110.036178.
- Противовирусные препараты для лечения ВИЧ-инфекции: Ингибиторы протеаз. Available at: <http://medzai.net/substances/atazanavir.php>.
- Hull M. W., Montaner J. S. G. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Annals of medicine*. 2011; 5(43): 375–388. DOI: 10.3109/07853890.2011.572905.
- Busti A. J., Hall R. G., Margolis D. M. Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2004; 12(24): 1732–1747. DOI: 10.1592/phco.24.17.1732.52347.
- Cateau E., Tournier N., Dupuis A., Moal G. L., Venisse N. Determination of atazanavir in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005; 3-4(39): 791–795. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.04.025.
- Cattaneo D., Maggiolo F., Ripamonti D., Perico N. Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatographic science*. 2008; 6(46): 485–489. DOI: 10.1093/chromsci/46.6.485.
- Кушакова А. С., Никитина Д. А., Новиков А. В. Методика определения концентрации атаканавира в плазме крови человека методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием. *Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез*. Материалы III Всероссийской конференции; 2017 21–27 мая, Краснодар, Россия. Краснодар: Кубанский государственный университет. 2017: 88.
- Reddy A.V.B., Jaafar J., Aris A.B., Majid Z.A., Umar K., Talib J., Madhavi G. Development and validation of a rapid ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of darunavir, ritonavir, and tenofovir in human plasma: Application to human pharmacokinetics. *Journal of separation science*. 2015; 15(38): 2580–2587. DOI: 10.1002/jssc.201500250.
- Mishra T., Shrivastav P. S. Validation of simultaneous quantitative method of HIV protease inhibitors atazanavir, darunavir and ritonavir in human plasma by UPLC-MS/MS. *The Scientific World Journal*. 2014. DOI: 10.1155/2014/482693.
- Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К. 2013: 280.
- Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.
- Reyataz. Available at: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_reyataz.pdf.
- Zaitseva N. N., Efimov E. I., Solntsev L. A. Electronic Atlas in HIV Surveillance. *Medical almanac*. 2014; 4(34): 63–67 (in Russ.).
- The epidemiological situation of HIV infection in Russia. Available at: <http://www.cgemo.ru/doks/news/epid-vich-2017.pdf> (in Russ.).
- Oleinik A. F., Fazylov V. Kh. Antiretroviral therapy as a method of preventing HIV infection. *Infectious diseases: news, opinion, education*. 2016; 3(6): 113–117 (in Russ.).

REFERENCES

4. Severe P., Juste M. A. J., Ambroise A., Eliacin L., Marchand C., Apollon S., Edwards A., Bang H., Nicotera J., Godfrey C., Gulick R. M., Johnson W. D., Pape J. W., Fitzgerald D. W. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *New England Journal of Medicine*. 2010; 3(363): 257–265. DOI: 10.1056/NEJMoa0910370.
5. Kravchenko A. V. Safety and efficacy of atazanavir as part of modern ART regimens. *Far Eastern Journal of Infectious Pathology*. 2010; 17: 220–235 (in Russ.).
6. Guaraldi G., Cocchi S., Motta A., Ciaffi S., Codeluppi M., Bonora S., Benedetto F.D., Masetti M., Floridia M., Baroncelli S., Pinetti D., D'Avolio A., Bertolini A., Esposito R. A pilot study on the efficacy, pharmacokinetics and safety of atazanavir in patients with end-stage liver disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 6(62): 1356–1364. DOI: 10.1093/jac/dkn383.
7. Wempe M. F., Anderson P. L. Atazanavir metabolism according to CYP3A5 status: an in vitro-in vivo assessment. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011; 3(39): 522–527. DOI: 10.1124/dmd.110.036178.
8. Antivirals for HIV: Protease Inhibitors. Available at: <http://medzai.net/substances/atazanavir.php> (in Russ.).
9. Hull M. W., Montaner J. S. G. Ritonavir-boosted protease inhibitors in HIV therapy. *Annals of medicine*. 2011; 5(43): 375–388. DOI: 10.3109/07853890.2011.572905.
10. Busti A. J., Hall R. G., Margolis D. M. Atazanavir for the treatment of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2004; 12(24): 1732–1747. DOI: 10.1592/phco.24.17.1732.52347.
11. Cateau E., Tourniera N., Dupuisb A., Moalc G.L., Venisse N. Determination of atazanavir in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005; 3-4(39): 791–795. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.04.025.
12. Cattaneo D., Maggiolo F., Ripamonti D., Perico N. Determination of atazanavir in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of chromatographic science*. 2008; 6(46): 485–489. DOI: 10.1093/chromsci/46.6.485.
13. Kushakova A. S., Nikitina D. A., Novikov A. V. Method for determining the concentration of atazanavir in human blood plasma by RP-HPLC with UV detection. *Analytical chromatography and capillary electrophoresis*. Materials of the III All-Russian Conference; 2017 May 21–27, Krasnodar, Russia. Krasnodar: Kuban State University; 2017: 88 (in Russ.).
14. Reddy A. V. B., Jaafar J., Aris A. B., Majid Z. A., Umar K., Talib J., Madhavi G. Development and validation of a rapid ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of darunavir, ritonavir, and tenofovir in human plasma: Application to human pharmacokinetics. *Journal of separation science*. 2015; 15(38): 2580–2587. DOI: 10.1002/jssc.201500250.
15. Mishra T., Shrivastav P. S. Validation of simultaneous quantitative method of HIV protease inhibitors atazanavir, darunavir and ritonavir in human plasma by UPLC-MS/MS. *The Scientific World Journal*. 2014. DOI: 10.1155/2014/482693.
16. Mironov A.N. Guidelines for the examination of medicines. T. II. M.: Grif and K. 2013: 280 (in Russ.).
17. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
18. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.
19. Reyataz. Available at: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_reyataz.pdf.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-109-114>
УДК 616.932:615.371



Обзорная статья/Review article

Обзор пострегистрационных изменений в процессе жизненного цикла вакцины холерной бивалентной химической (обзор)

И. В. Шульгина^{1*}, О. А. Лобовикова¹, О. А. Волох¹, О. В. Громова¹, А. К. Никифоров^{1,2},
А. В. Комиссаров^{1,2}, В. А. Демченко¹, А. С. Феськова¹, С. С. Галетова¹, Н. П. Миронова¹,
В. И. Павлова¹

1 – ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова» (СГАУ), 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

*Контактное лицо: Шульгина Ирина Витальевна. E-mail: shulgina_iv@microbe.ru

Статья получена: 25.12.2019. Статья принята к печати: 11.02.2020

Резюме

Введение. Неизбежность пострегистрационных изменений обусловлена совершенствованиями процессов производства и контроля качества, связанными с внедрением современных технологических решений, заменой оборудования, поставщиков сырья, расходных и упаковочных материалов, совершенствованием формы выпуска или состава, административными изменениями, а также получением новых данных о клинической эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) в ходе постмаркетинговых исследований.

Текст. Цель настоящего обзора – анализ пострегистрационных изменений в процессе жизненного цикла ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, отражающих гармонизацию документов регистрационного досье с нововведениями Российского законодательства, оптимизацию производства и контроля качества. В первую очередь, изменения, вносимые в регистрационную документацию на ИЛП, касались актуализации досье в соответствии с принятыми федеральными законами и постановлениями Правительства РФ. Следующие изменения относились к оптимизации методов контроля предельного содержания примесей веществ, используемых на различных стадиях производства антигенов. Также изменения были связаны с улучшением потребительских свойств лекарственного препарата, а именно внедрением современной полимерной упаковки и нескольких вариантов фасовки, удобной для применения в учреждениях практического здравоохранения. Последнее изменение ФСП регламентирует нанесение на упаковку лекарственных препаратов средства идентификации в виде двухмерного штрихового кода (QR-кода), что обусловлено выполнением требований статьи 67 «Информация о лекарственных препаратах. Система мониторинга движения лекарственных препаратов (МДЛП) для медицинского применения» Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Заключение. Сохранение необходимого уровня качества ИЛП при изменении технологии производства или контроля требует всестороннего анализа предлагаемых изменений с целью последующего внесения их в документы регистрационного досье. При этом гармонизация документов регистрационного досье с новеллами российского законодательства является необходимым условием для осуществления производственной деятельности в рамках правового поля.

Ключевые слова: регистрационное досье, фармакопейная статья предприятия, вакцина холерная бивалентная химическая, пострегистрационные изменения.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. И. В. Шульгина, О. А. Лобовикова, В. А. Демченко, А. С. Феськова участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в подборе и анализе материалов, обсуждении текста статьи.

Для цитирования: Шульгина И. В., Лобовикова О. А., Волох О. А., Громова О. В., Никифоров А. К., Комиссаров А. В., Демченко В. А., Феськова А. С., Галетова С. С., Миронова Н. П., Павлова В. И. Обзор пострегистрационных изменений в процессе жизненного цикла вакцины холерной бивалентной химической. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 109–114.

Review of Post-registration Changes in the Life Cycle of Cholera Bivalent Chemical Vaccine (Review)

Irina V. Shulgina^{1*}, Oxana A. Lobovikova¹, Oxana A. Voloh¹, Olga V. Gromova¹,
Alexey K. Nikiforov^{1,2}, Alexandr V. Komissarov^{1,2}, Victoria A. Demchenko¹, Anna S. Fes'kova¹,
Svetlana S. Galetova¹, Natalya P. Mironova¹, Varvara I. Pavlova¹

1 – Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

2 – Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov, 1, Teatrnaya ploshchad', Saratov, 410012, Russia

*Corresponding author: I. V. Shulgina. E-mail: shulgina_iv@microbe.ru

Received: 25.12.2019. Accepted: 11.02.2020

Abstract

Introduction. The inevitable of post-registration variations due to the improvement of production processes and quality control related to the integration of the modern technological solutions, replacement of equipment, suppliers of raw, consumables and packaging materials, improvement of form release or composition, administrative changes, as well as obtaining new data on clinical efficacy and safety of immunobiological medicinal products (IMP) during post-marketing studies.

© Шульгина И. В., Лобовикова О. А., Волох О. А., Громова О. В., Никифоров А. К., Комиссаров А. В., Демченко В. А., Феськова А. С., Галетова С. С., Миронова Н. П., Павлова В. И., 2020

© Shulgina I. V., Lobovikova O. A., Voloh O. A., Gromova O. V., Nikiforov A. K., Komissarov A. V., Demchenko V. A., Fes'kova A. S., Galetova S. S., Mironova N. P., Pavlova V. I., 2020

Text. The purpose of this work is to analyze the post-registration changes in the life cycle of IMP «Cholera bivalent chemical Vaccine» produced by Russian State anti-plague Research Institute «Microbe», reflecting the harmonization of the documents of the registration dossier with the innovations of the Russian legislation, the optimization of production and quality control. First of all, the changes made to the registration documentation for IMP concerned the updating of the dossier in accordance with the adopted Federal laws and Resolutions of the government of the Russian Federation. The following changes related to the optimization of methods for controlling the limit content of impurities of substances used at different stages of antigen production. Also, the changes were associated with the improvement of consumer properties of the drug, namely the introduction of modern polymer packaging and several drug's form release, convenient for use in practical health care institutions. The latest change of Pharmacopoeia enterprise article (PEA) R N001465/01-111119 regulates the application of identification means in the form of a two-dimensional bar code (QR-code) on the packaging of medicines, which is due to compliance with the requirements of article 67 «Information on medicines. The system of monitoring the movement of medicines» Federal law N 61 «On medicines circulation».

Conclusion. Maintaining the required level of quality of IMP when changing production technology or control requires a comprehensive analysis of the proposed changes in order to make them in the documents of the registration dossier. At the same time harmonization of documents of the registration dossier with novelties of the Russian legislation is a necessary condition for implementation of production activity within the legal field.

Keywords: registration dossier, Pharmacopoeia monograph, cholera bivalent chemical vaccine, post-registration changes.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Irina V. Shulgina, Oxana A. Lobovikova, Victoria A. Demchenko, Anna S. Fes'kova participated in writing the text of the article. All authors participated in the collection and analysis of materials, discussion of the text of the article.

For citation: Shulgina I. V., Lobovikova O. A., Voloh O. A., Gromova O. V., Nikiforov A. K., Komissarov A. V., Demchenko V. A., Fes'kova A. S., Galetova S. S., Mironova N. P., Pavlova V. I. Review of post-registration changes in the life cycle of cholera bivalent chemical vaccine. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 109–114.

ВВЕДЕНИЕ

Для обеспечения непрерывного поддержания качества в ходе жизненного цикла ИЛП у производителя возникает необходимость внесения изменений, которые должны быть отражены в регистрационном досье. Неизбежность пострегистрационных изменений обусловлена совершенствованиями процессов производства и контроля качества, связанными с внедрением современных технологических решений, заменой оборудования, поставщиков сырья, расходных и упаковочных материалов, совершенствованием формы выпуска или состава, административными изменениями, а также получением новых данных о клинической эффективности и безопасности ИЛП в ходе постмаркетинговых исследований.

Правила надлежащей производственной практики (приказ Минпромторга Российской Федерации от 14 июля 2013 г. № 916 «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств»), определяющие требования к фармацевтической системе качества, обязывают производителя проводить перспективную оценку влияния запланированных изменений на эффективность, качество и безопасность ИЛП в рамках системы управления изменениями на предприятии. В случаях, определяемых приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 13 декабря 2016 года № 959н «Классификация изменений, вносимых в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения», изменения до их внедрения должны быть со-

гласованы с уполномоченным федеральным органом исполнительной власти (Министерством здравоохранения Российской Федерации).

Цель настоящего обзора – анализ пострегистрационных изменений в процессе жизненного цикла ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, отражающих гармонизацию документов регистрационного досье с нововведениями российского законодательства, оптимизацию производства и контроля качества.

ИСТОРИЯ РАЗРАБОТКИ И РЕГИСТРАЦИИ ВАКЦИНЫ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ

С началом седьмой пандемии холеры, начиная с 1965 г., на территории бывшего СССР практически ежегодно отмечались небольшие вспышки и sporadические случаи заболевания, вибриононосительства и выделения холерных вибрионов из различных водоемных источников. В 1970 г. на территории Астраханской области была зарегистрирована эпидемия холеры, во время которой заболело 1271 человек, выявлено 1120 вибриононосителей, 11 случаев имели летальный исход. Возникновение крупной эпидемии холеры в Астраханской области сопровождалось широким распространением инфекции водным транспортом в портовые города, расположенные на Волге, Каспийском и Черном морях. Вспышки холеры были отмечены в Волгограде, Саратове, Ростове-на-Дону, Куйбышеве (Самаре), Сызрани, Кирове, Перми, Горь-

ком (Нижний Новгород), Керчи, Одессе, Новороссийске и других городах.

В этот период резко возрос интерес к изучению вопросов микробиологии, иммунологии и профилактики холеры. В конце 60-х годов была начата разработка химических холерных вакцин для парентеральной иммунизации на основе новых данных о ведущем значении в формировании эффективного иммунитета антител против LPS-структур возбудителя инфекции, ферментов метаболизма и токсинов [1].

В 1971–1973 гг. в институте была разработана и внедрена в практику здравоохранения холерная вакцина, содержащая холероген-анатоксин, предназначенная для подкожного введения. В 1974 г. вакцина была усовершенствована путем добавления О-антигенов холерных вибрионов [2].

С 1974 года начались работы по созданию новой лекарственной формы вакцины – таблетки. В 1981 году в ходе авторских испытаний вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, состоящей из смеси О-антигенов серовара Инаба, Огава и холерогена-анатоксина, на 19 здоровых добровольцах была доказана ареактогенность, безвредность и определена оптимальная прививочная доза, составляющая 3 таблетки [3].

В 1988 году на основании приказа Минздрава СССР № 24 от 12.01.1981 г. и решения Комитета по вакцинам и сывороткам (протокол № 4 от 10.08.1988 г.) были проведены государственные клинические испытания на 276 курсантах военного училища. Вакцина вызывала специфические изменения в иммунном статусе вакцинированных, характеризующиеся образованием вибриоцидных, антитоксических и копроантител в титрах не ниже, чем у переболевших холерой. Преимуществом таблетированной вакцины перед коммерческим аналогом (холероген-анатоксин + О-антиген) для подкожного применения явились безвредность, антиреактогенность, удобная для массовой вакцинации лекарственная форма, что дало основание рассматривать новый препарат как наиболее эффективное средство массовой иммунопрофилактики холеры [4].

В 1989 г. специалистами института были разработаны нормативно-технические документы: экспериментально-производственный регламент ЭПР № 282-90, утвержденный директором института и согласованный с национальным органом контроля МИБП (НОК МИБП) – ГИСК им. Л. А. Тарасевича; и временная фармакопейная статья ВФС-42-269-ВС-90, утвержденная заместителем министра здравоохранения от 03.12.90 г.

В 1990 году Комитетом МИБП было принято решение о внедрении вакцины холерной бивалентной химической таблетированной в практику здравоохранения (протокол № 5 от 18.04.1990 г.).

В 1994 году был разработан и согласован с национальным органом контроля МИБП производствен-

ный регламент ПР № 479-94, что позволило начать серийный выпуск препарата в июне 1995 г. В период с 1995 года по 2002 год было выпущено 45 коммерческих серий вакцины.

В 2002 году впервые было оформлено регистрационное удостоверение Р N001465/01-2002 от 13.06.2002 г. на лекарственное средство «Вакцина холерная бивалентная химическая таблетированная» сроком действия 5 лет до 13.06.2007 г., разрешающее медицинское применение и промышленный выпуск в Российской Федерации (нормативная документация – ФСЦ 42-0020-0020-00 сроком действия до 19.07.2005 г.).

ФСЦ 42-0020-0020-00 предусматривала выпускающий контроль качества вакцины холерной по показателям: описание; распадаемость; масса таблетки; потеря в массе при высушивании; микробиологическая чистота; токсичность на белых мышах; специфическая безопасность на кроликах; подлинность и специфическая активность: антигенная активность по анатоксинам, связыванию на кроликах, содержание О-антигена в реакции непрямой гемагглютинации, иммуногенная активность на белых мышах; реактогенность на 5 ранее неиммунизированных добровольцах; формалин; ионы аммония и сульфат-ионы; упаковка; маркировка.

ПОСТРЕГИСТРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Процедура перерегистрации ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» была осуществлена в 2008 году в связи с окончанием срока действия ФСЦ и РУ. В результате получено бессрочное регистрационное удостоверение на ИЛП Р N001465/01 от 22.07.2008 г.

На основе данных об иммунологической эффективности и безопасности применения в течение 13 лет обращения на рынке, экспертизы качества образцов лекарственного препарата в НОК МИБП (экспертное заключение ГИСК им. Л. А. Тарасевича на ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» от 27.02.2008 г.), было принято решение об исключении показателя «реактогенность» из ФСЦ Р N001465/01 (выписка из протокола № 1 Комитета МИБП от 28.02.2008 г.). Исследование реактогенности каждой 5-й серии вакцины на 5 ранее неиммунизированных добровольцах было крайне затруднительно ввиду проблем этического и юридического характера, поэтому исключение данного показателя при утверждении ФСЦ Р N001465/01-220708 существенно упростило выпускающий и последующий контроль качества.

В период с 2006 по 2010 гг. производство «Вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой» (Р N001465/01-220708) осуществлялось на основании лицензии для осуществления деятельности по производству лекарственных средств № 99-04-000257, выданной Федеральной службой по надзору в сфере здравоохра-

нения и социального развития 21.12.2006 г. сроком действия 5 лет.

С 2010 по 2012 гг. производство «Вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой» было временно приостановлено в связи с капитальным ремонтом и модернизацией технологической линии.

В 2011 году на основании Федерального закона от 8 мая 2010 г. N 83-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в связи с совершенствованием правового положения государственных (муниципальных) учреждений» была изменена организационно-правовая форма Федерального государственного учреждения здравоохранения РосНИПЧИ «Микроб», что потребовало внесения изменений в учредительные документы организации, лицензии на различные виды деятельности, а также в регистрационные документы на производимую продукцию.

После завершения реконструкции производства холерной вакцины в 2012 году и в связи с изменением названия учреждения была переоформлена лицензия на осуществление деятельности по производству, хранению и реализации нестерильных иммунобиологических лекарственных препаратов (вакцин) в форме таблеток, покрытых оболочкой (Лицензия № 11919-ЛС-П от 03 октября 2012 г., выдана ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора Министерства промышленности и торговли Российской Федерации).

Изменение наименования держателя РУ на Федеральное казенное учреждение здравоохранения было закреплено в изменениях № 1 ФСР Р N001465/01-190613. Кроме того, маркировка упаковки приведена в соответствие требованиям статьи 46 «Маркировка лекарственных средств» Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Таким образом, в регистрационное досье были внесены изменения, касающиеся титульного листа и раздела «Маркировка» ФСР, макетов первичной и вторичной (потребительской) упаковок; переоформлено регистрационное удостоверение РУ 001465/01 от 19.06.2013 г.

В связи с новым наименованием предприятия-изготовителя (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) и ликвидацией НОК МИБП – ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича Роспотребнадзора в 2015 году были оформлены изменения № 1 в инструкцию по применению ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» относительно производителя – адресата для направления рекламаций на качество препарата.

В связи с реформированием в системе подтверждения соответствия продукции, созданием единой национальной системы аккредитации (указ президента Российской Федерации от 24 января 2011 г. № 86 «О единой национальной системе аккредитации»), у производителей лекарственных средств появилась

возможность обращения в различные органы сертификации и испытательные лаборатории, имеющие соответствующие области аккредитации.

При проведении испытаний с целью подтверждения соответствия «Вакцины холерной бивалентной химической» требованиям ФСР в аккредитованных лабораториях возникла необходимость оптимизации методов контроля предельного содержания примесей веществ, используемых на различных стадиях производства антигенов. Изменением № 2 ФСР Р N001465/01-200415 были внесены коррективы в разделы «Ионы аммония и сульфат-ионы», «Формалин».

Из ФСР был исключен раздел «Ионы аммония и сульфат-ионы» в связи с присутствием в готовой лекарственной форме (таблетках, покрытых кишечнорастворимой оболочкой) вспомогательных веществ, препятствующих проведению анализа примесей. При проведении пробоподготовки образцов ИЛП не удастся полностью избавиться от талька, крахмала, целлацефата и стеарата кальция, создающих фон при измерении оптической плотности раствора при проведении колориметрического и турбидиметрического анализа по показателю «ионы аммония и сульфат-ионы». Промышленный регламент предусматривает проведение контроля освобождения от примесей сульфата аммония, используемого для фракционирования антигенных компонентов вакцины (холероген-анатоксина и О-антигенов). Ретроспективный анализ протоколов технологических операций досье на серии продукции, выпущенные в течение 2008–2014 гг., показал отсутствие ионов аммония и сульфат-ионов в полуфабрикатах вакцины. В процессе повторной валидации аналитических методик определения ионов аммония и сульфат-ионов было доказано, что используемые методы позволяют достоверно выявлять примеси с необходимым пределом обнаружения. Таким образом, исключение показателей контроля из спецификации готовой продукции не оказало негативного влияния на ее качество.

В новой редакции раздела «Формалин» детально представлена пробоподготовка, позволяющая исключить отрицательное влияние фоновых реакции вспомогательных веществ для достижения оптической прозрачности в используемой области длин волн и при визуальном учете результатов.

Следующие изменения № 3 в ФСР Р N001465/01-030718 связаны с улучшением потребительских свойств лекарственного препарата, а именно внедрением современной полимерной упаковки и нескольких вариантов фасовки, удобной для применения в учреждениях практического здравоохранения.

ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» выпускали упакованной в стеклянные флаконы по 210 таблеток (70 человеко-доз). Объем фасовки был обоснован масштабной вакцинацией населения в период эпидемии. В настоящее время препарат «Вак-

цина холерная бивалентная химическая» включен в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. В межэпидемический период вакцинацию против холеры проводят лицам, выезжающим в неблагополучные по холере страны (регионы), а также населению субъектов Российской Федерации в случае осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки по холере в сопредельных странах, а также на территории Российской Федерации [Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 125н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям» (с изм. и доп.)]. Отсутствие потребности в одновременной иммунизации большого количества пациентов явилось обоснованием для выпуска препарата в фасовке по 30, 60, 150 таблеток, соответствующих 10, 20, 50 человеко-доз.

Для новых вариантов фасовки была подобрана первичная упаковка – банка полимерная с крышкой контроля первого вскрытия. Внедрение новой первичной упаковки позволило сократить число технологических операций (ликвидация стадий подготовки полуавтомата для закатки алюминиевых колпачков, герметизации стеклянных флаконов резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками), что привело к уменьшению материальных, временных затрат и снижению себестоимости. Использование легкой, устойчивой к механическим воздействиям полимерной первичной упаковки облегчает хранение и транспортирование. Для подтверждения сохранения качества и срока годности лекарственного препарата в новой первичной упаковке были проведены испытания стабильности ИЛП методами «ускоренного старения» и долгосрочной стабильности в соответствии с ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» (Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. / МЗ РФ. М., 2015. 1470 с.).

Последние изменения ФСП потребовали оформления регистрационного удостоверения, макеты первичной, вторичной упаковок и инициировали процедуру пересмотра инструкции по медицинскому применению в соответствии с требованиями, определенными статьей 18 Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 г.

Изменение № 4 ФСП Р N001465/01-111119 обусловлено выполнением требований статьи 67 «Информация о лекарственных препаратах. Система мониторинга движения лекарственных препаратов (МДЛП) для медицинского применения» Федерального закона № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 г. в ред. от 13.08.2019 г., постановления Правительства РФ «Об утверждении Положения о системе мониторинга движения лекарственных препаратов для медицинского применения» № 1556 от 14.12.2018 г. Создание системы МДЛП обусловлено необходимостью контроля со стороны государства за движением

лекарственных препаратов от производителя до потребителя в целях борьбы с фальсификацией, профилактики неэффективного расходования бюджетных средств; оперативного планирования объемов производства и управления резервами препаратов. Для обеспечения работы системы МДЛП производители препаратов средства идентификации в виде двухмерного штрихового кода (QR-кода). Изменениями № 4 ФСП предусмотрено нанесение QR-кода на не отделяемый от вторичной упаковки стикер.

В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 749 от 31 октября 2018 года «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей и признании утратившими силу некоторых приказов Минздравмедпрома России, Минздравсоцразвития России и Минздрава России» начата работа по приведению фармакопейной статьи предприятия Р N001465/01 «Вакцина холерная бивалентная химическая» в соответствие с Государственной Фармакопеей Российской Федерации XIV издания, которую планируется завершить до 1 января 2022 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунобиологические лекарственные препараты являются сложными препаратами, действующее вещество которых произведено или выделено с использованием биологических систем. Поэтому для сохранения необходимого уровня качества при изменении технологии производства или контроля требуется всесторонний анализ предлагаемых изменений с целью последующего внесения их в документы регистрационного досье. Обоснованность отсутствия отрицательного влияния вносимых изменений на качество, эффективность и безопасность ИЛП должна быть доказана производителем регламентированными методами исследований и подтверждена в ходе экспертизы в уполномоченном федеральном органе исполнительной власти учреждении [5, 6].

Изменения административного характера и прочие, не требующие проведения экспертизы качества и отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата, носят, как правило, уведомительный характер.

Гармонизация документов регистрационного досье с новеллами Российского законодательства является необходимым условием для осуществления производственной деятельности в рамках правового поля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков-Вережников Н. Н. Адамов А. К., Коробкова Е. И. и др. Особенности эпидемиологии современной холеры и задачи усовершенствования методов ее профилактики. В кн.: *Итоги работы противочумных учреждений за 1964–1968 гг. и перспективы их*

дальнейшей деятельности: тез. докл. к конф. – Саратов. 1969: 138–141.

2. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» – 100 лет / Под ред. докт. мед. наук, проф. А. Ю. Поповой, акад. РАН, докт. мед. наук, проф. В. В. Кутырева. – Красноярск: ООО «Красногорский полиграфический комбинат». 2018: 368.
3. Джапаридзе М. Н. и др. Биологическая и иммунологическая характеристика новой оральной холерной бивалентной вакцины и результаты испытания на добровольцах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1982; 11: 29.
4. Сумароков А. А., Джапаридзе М. Н., Резников Ю. Б., Рысцова Е. А., Матусевич Л. Я., Никитина Г. П., Плотникова М. Н., Шустов В. Я., Королев В. В., Елисеев Ю. Ю., Дробышева Т. М., Адамова Г. В., Мелешенко М. В., Коваленко Н. М., Коткина Т. А., Громова О. В. Реактогенность и иммунологическая эффективность новой оральной холерной химической бивалентной вакцины в ограниченном контролируемом опыте ревакцинации людей. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1993: 143–148.
5. Шевцов В. А., Олефир Ю. В., Меркулов В. А., Бондарев В. П., Индикова И. Н., Евреина Е. Э., Рукавишников А. В., Хантимирова Л. М., Горенков Д. В. Внесение изменений в документы регистрационных досье на вакцины: анализ нормативно-методических подходов в Российской Федерации и за рубежом. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019; 9(1): 41–48. Doi: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-1-41-48>.
6. Петранева Е. В., Проскурина И. А., Горячев Д. В., Ковалева Е. Л. Формирование подхода к оценке пострегистрационных изменений биологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 9(2): 109–117. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-9-2-109-117>.

REFERENCES

1. Zhukov-Verezhnikov N. N., Adamov A. K., Korobkova E. I. et al. Features of the epidemiology of modern cholera and the task of improving methods for its prevention. In the book: *Results of the work of antiplague institutions for 1964–1968 and prospects for their future activities: thesis. doc. to conf.* – Saratov. 1969: 138–141 (in Russ.).
2. Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» – 100 years / Ed. Doct. honey. sciences, prof. A. Yu. Popova, Acad. RAS, Doct. honey. sciences, prof. V. V. Kutyreva. – Krasnogorsk: LLC Krasnogorsk Printing Plant. 2018: 368 (in Russ.).
3. Dzhabaridze M. N. et al. Biological and immunological characteristics of a new oral cholera bivalent vaccine and test results on volunteers. *Journal of microbiology epidemiology immunobiology*. 1982; 11: 29 (in Russ.).
4. Sumarokov A. A., Dzhabaridze M. N., Reznikov Yu. B., Rystsova E. A., Matusevich L. Ya., Nikitina G. P., Plotnikova M. N., Shustov V. Ya., Korolev V. V., Eliseev Yu. Yu., Drobysheva T. M., Adamova G. V., Meleshenko M. V., Kovalenko N. M., Kotkina T. A., Gromova O. V. Reactogenicity and immunological efficacy of a new oral cholera chemical bivalent vaccine in a limited controlled experience of human revaccination. *Problems of particularly dangerous infections*. 1993: 143–148 (in Russ.).
5. Shevczov V. A., Olefir Yu. V., Merkulov V. A., Bondarev V. P., Indikova I. N., Evreinova E. E., Rukavishnikov A. V., Khantimirova L. M., Gorenkov D. V. Post-approval variations to dossiers for vaccines: analysis of regulatory and methodological approaches used in the Russian Federation and abroad. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019; 9(1): 41–48. Doi: <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-1-41-48> (in Russ.).
6. Petraneva E. V., Proskurina I. A., Goryachev D. V., Kovaleva E. L. Development of an approach to the assessment of changes to approved biological products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019; 9(2): 109–117. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-9-2-109-117> (in Russ.).

Рецензия на книгу доктора фармацевтических наук К. С. Гузева «Очерки по истории фармации»

История фармации как наука уходит к глубокой древности и связана с развитием первых цивилизаций, таких как Шумеры, Китай, Индия, Греция, Римская империя и др. Зачастую, история фармации затенялась и отодвигалась резкими скачками в области медицины, что делало её на первый взгляд незначимой и вторичной. Однако изначально медицина и фармация шли рука об руку, развиваясь и совершенствуясь параллельно. И сегодня роль фармации в области здравоохранения является столь же важной, как и роль непосредственно прикладной медицины.

В этой связи значительный интерес представляет информация о том, как складывалась фармацевтическая наука и сама фармация на протяжении столетий. Автором книги «Очерки по истории фармации» является уполномоченное лицо АО «Ретиноиды», доктор фармацевтических наук К. С. Гузев, имеющий многолетний опыт деятельности как непосредственно в области практической части фармации, так и работы, посвящённой Галену, Альдо Кастеллани, истории создания «жидкости Розенталя» и т. д.

Книга написана по интересному плану – первоначально заинтересовать потенциального читателя так называемой «ролью личности в истории», чтобы в дальнейшем продемонстрировать созданный ими базис, интересные находки и решения. В конце концов, как говорил Роберт Бертон в своей «Анатомии меланхолии»: «Если я видел дальше других, то потому, что стоял на плечах гигантов», таким образом, признавая огромную заслугу первопроходцев и ярких личностей, создававших фундамент науки в целом.

Поэтому первая часть книги называется «Известные и неизвестные» и включает в себя биографии не только «светил» фармацевтической науки того времени, но и некоторых малоизвестных врачей, фармацевтов, биологов, сыгравших значительную роль в развитии фармации. Отличительной чертой этой науки тогда, да и сейчас, является необходимость междисциплинарного взаимодействия для достижения требуемого результата, что отлично продемонстрировано на примере представленных учёных.

Также следует отметить, что автор книги приводит не только личное мнение, но и оценки их решений, идей и творческих находок непосредственно специалистами. Причём написано всё без лишней сухости, с увлекательными подробностями их личных и творческих биографий. Данная манера изложения применяется во всей книге и, несомненно, будет способствовать наиболее благоприятному усвоению материала при использовании его в учебном процессе.

От личностей – к плодам их творчества. Вторая глава повествует об отдельных фрагментах истории фармации. Необходимо отметить, что в данной книге впервые систематизирован с точки зрения постепенного развития весь набор применяемых в медицине и фармации лекарственных средств, начиная от Шумеров и до первых веков н. э., включая рассмотрение отдельных лекарственных препаратов и технологических приёмов, изначально находившихся в практике врачей. Отдельного внимания заслуживает ряд очерков о медицине Древнего Египта, ярко и детально показывающих состояние взаимодействия области создания и применения лекарственных средств.

Отличительной особенностью книги являются несколько моментов.



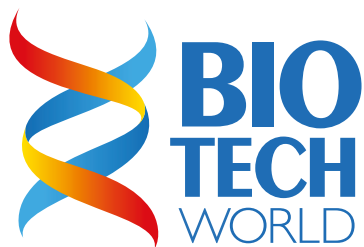
Во-первых, уделяется необходимое внимание качественному и линейному росту российской фармацевтической науки в XVII–XVIII вв. Данный сегмент важен для понимания отечественных особенностей взаимодействия медицины и фармации и зачастую упускается в других пособиях и книгах по схожей тематике.

Во-вторых, интересным решением представляется третья часть книги о применении конкретных лекарственных средств, а именно, фармацевтических субстанций нафталанской нефти и мёда, что представляет собой логично выверенную следующую ступень уже проведённого автором исследования (по изучению применения в отечественной фармации и медицине берёзового дёгтя).

Резюмируя, отметим, что основным достоинством данной книги является лёгкость изложения серьёзного и проработанного материала, значительная часть которого описывается впервые. Талантливо и по-настоящему со знанием дела автор погружает нас не просто в сухой академический мир истории науки, а стимулирует на поиски нового, пока ещё неясного и непонятного.

Таким образом, книга «Очерки по истории фармации» К. С. Гузева является увлекательным, а, главное, ценным и нужным источником знаний в области истории фармации, и может стать полезной не только в учебном процессе, но и для всех, интересующихся данной тематикой.

*Доктор фармацевтических наук, профессор,
заведующий кафедрой фармации
Медицинского университета «Реавиз» (Москва)
К. В. Алексеев*



XVIII МЕЖДУНАРОДНАЯ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА

БИОТЕХПРОМ & АНАЛИТИКА

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

- Аналитика
- БИОФарма
- Функциональные продукты питания
- БИОЛаб
- БИОСофт
- БИОМед
- БИОАгро
- БИОВенчур, БИОФранчайзинг, Стартапы, Кластеры, Технопарки
- Промышленная биотехнология
- Лабораторная мебель БИОЛабДрайв

XVIII МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

ОСНОВНЫЕ ПОТОКИ ФОРУМА

- Фундаментальные вопросы биотехнологии
- Геномная инженерия
- Биотехнология и медицина
- Биофарма
- Биоинформатика
- Сельское хозяйство
- Бизнес-секции
- Биотехнологии в АПК: практика реализации
- Биоорганические пластики и методы их переработки

О
Н
О
Н

27-29 МАЯ
МОСКВА
ГОСТИНЫЙ ДВОР



МИНПРОМТОРГ
РОССИИ



RED
GROUP

+7 (495) 780-41-09
+7 (495) 722-20-74

info@biomos.ru
www.biomos.ru

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&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах и не повторять название статьи.

АНГЛОЯЗЫЧНЫЙ БЛОК

Article title

Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

Affiliation

Необходимо указывать официальное англоязычное название учреждения и почтовый адрес. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: <http://elibrary.ru>

Образец оформления

Mental Health Research Institute

4, Aleutskaya Str., Tomsk, 634014, Russian Federation

Abstract

Резюме статьи на английском языке должно по смыслу и структуре (для оригинальной статьи: Introduction, Aim, Materials and methods, Results and discussion, Conclusion; для обзорной статьи: Introduction, Text, Conclusion) соответствовать русскоязычному, по содержанию может быть более полным. Необходимо использовать активный, а не пассивный залог. Во избежание искажения основных понятий желательно иметь соответствующие английские термины. Это особенно важно, когда приводятся названия особых заболеваний, синдромов, упоминаются авторы или конкретные методы.

Keywords

Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

ОСНОВНОЙ ТЕКСТ

Оригинальные статьи должны иметь следующую структуру: а) введение; б) материалы и методы; в) результаты; г) обсуждение; д) заключение.

Обзорные статьи должны иметь следующую структуру а) введение; б) текст; д) заключение.

Текст обзорной статьи следует разделять на соответствующие содержанию статьи подразделы.

Введение

В разделе дается обоснование актуальности исследования и четко формулируется цель исследования.

Материалы и методы

Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии — группировочного или химического названия. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru). При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру вы-

данных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов.

При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения [Пример: хлористоводородная кислота, х.ч. (Сигма Тек, Россия)]. При описании специфических импортных реактивов [Пример: из каталога Sigma-Aldrich] необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива.

При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности [Пример: 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. Внутрисписочные 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.



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри



Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10
от 08.10.2014

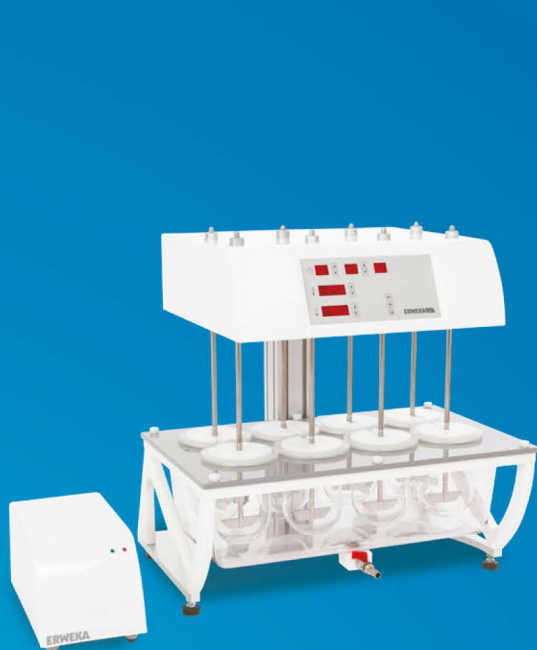
Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09
от 30.04.2009 на выполнение работ с
микроорганизмами 3-4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

Серия тестеров растворения

ERWEKA DT light

Экономичные тестеры с ручным отбором проб

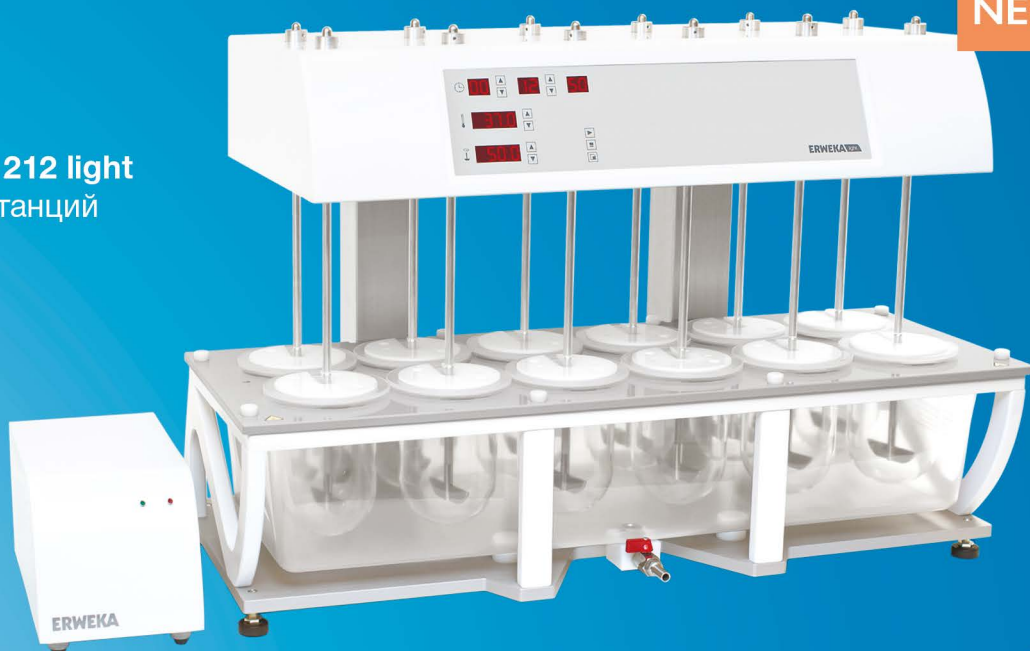


DT 128 light
8 станций



DT 126 light
6 станций

DT 1212 light
12 станций



ООО «ЭРВЕКА»

Тел.: +7 (499) 110 90 60
sales@erweka-russia.ru

ERWEKA light

MUST HAVE ДЛЯ ВАШЕГО ВЭЖХ!

УСПЕЙТЕ ПРИОБРЕСТИ ДО 31 МАРТА 2020г. ГРАДИЕНТНУЮ СИСТЕМУ ВЭЖХ RIGOL L-3000!

Система включает:

1. насос на 4 растворителя со встроенным дегазатором и системой промывки плунжеров L-3245,
2. ручной инжектор Rheodyne 7725i,
3. термостат колонки L-3400,
4. детектор УФ/Вид поглощения L-3500,
5. ПО Ultrachrom.

Цена 16 000,00 \$!

В подарок вы получите:

- компьютер,
- колонка для ВЭЖХ C18.

RIGOL
Beyond Measure



СДЕЛАЙТЕ ПРАВИЛЬНЫЙ ХОД...



...С ВИАЛАМИ И КРЫШКАМИ ОТ MASCHEREY-NAGEL!

Промо-цены на продукцию для ВЭЖХ,
ГХ и парофазной хроматографии
с 1 января до 31 марта 2020 года!

Скачать
прайс →



РАСТВОРИТЕЛИ ДЛЯ ВЭЖХ



«ХИММЕД» – единственный производитель метанола и ацетонитрила высших квалификаций в России (ОСЧ для градиентной, газовой, жидкостной хроматографии, ВЭЖХ, УФ-спектроскопии, сухой, хч):

- европейское качество,
- соответствие ГФ РФ и Ph.Eur,
- наличие на складе,
- низкие цены.

КАРТРИДЖИ ДЛЯ СИСТЕМ ОЧИСТКИ ВОДЫ «MERCK MILLIPORE»



Скачать
прайс →



Предлагаем также со склада в Москве и под заказ весь ассортимент продукции «Merck Millipore»: системы очистки воды, мембраны, шприцевые фильтры, оборудование для фильтрации и др.



СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

«ХИММЕД» – авторизованный дистрибьютер USP на территории РФ. Более 3600 стандартов доступно для заказа, поставка от 15 до 25 дней. Стандартные образцы предназначены для использования в идентификационных тестах, предельных тестах на наличие примесей или связанных с ними соединениях, анализах на лекарственные вещества и составы, и др.



Authorized Distributor

