

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION



СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

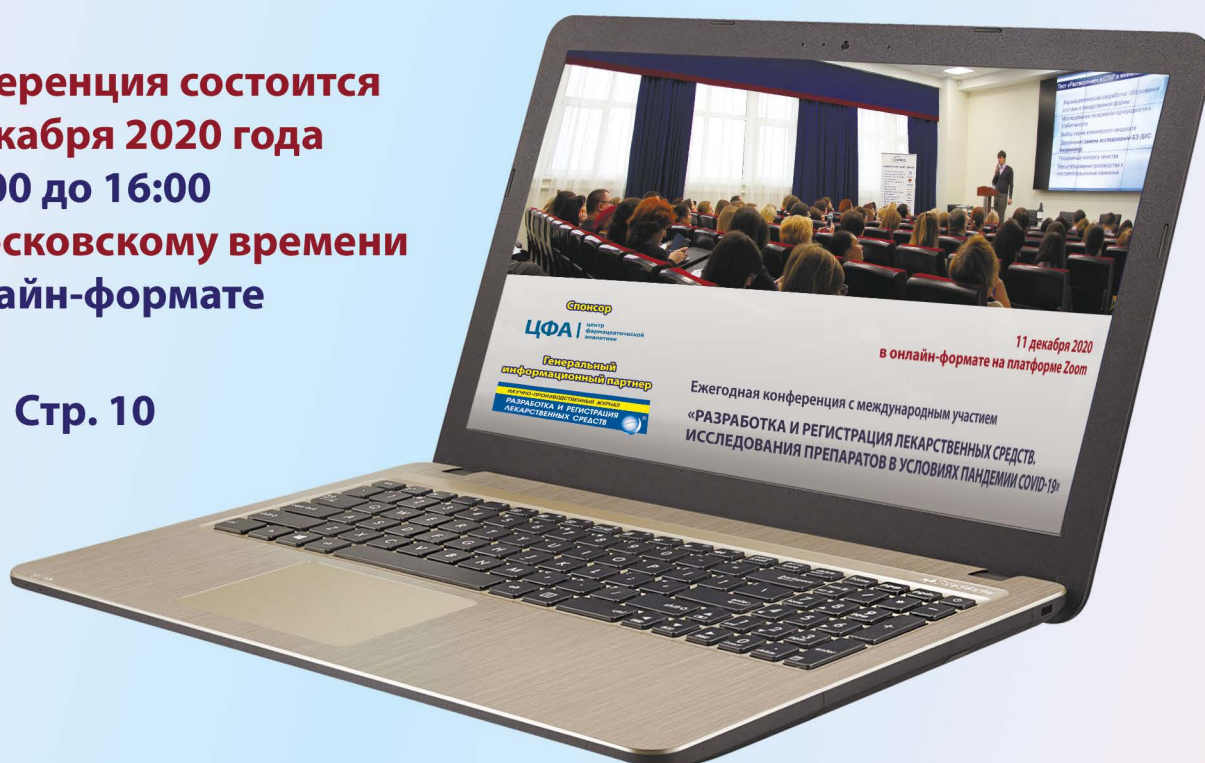


ЦФА | центр
фармацевтической
аналитики

Ежегодная конференция с международным участием
«Разработка и регистрация лекарственных средств»

**Конференция состоится
11 декабря 2020 года
с 11:00 до 16:00
по московскому времени
в онлайн-формате**

Стр. 10

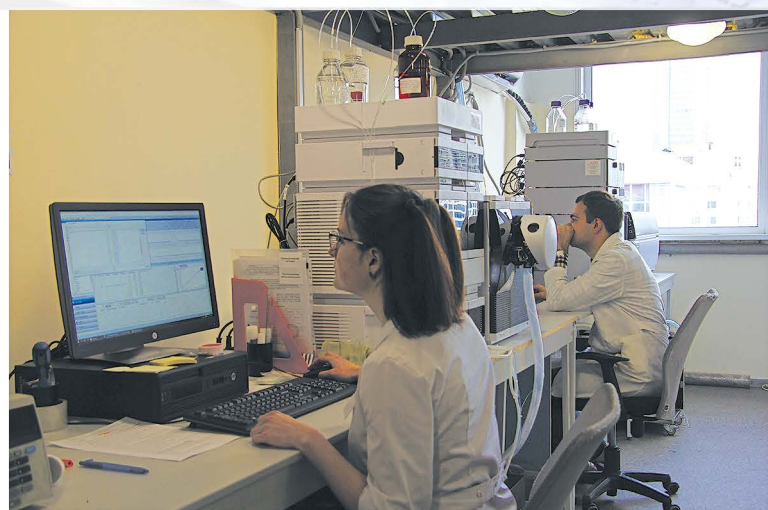




ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») – сертифицированный по требованиям GLP (ГОСТ 33044-2014) лабораторный центр, выполняющий высококачественные исследования в области разработки и контроля инновационных и воспроизведенных лекарственных средств, что является крайне актуальным с учетом действующих 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) химико-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.



При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»



РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2020. Том 9, № 4

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2020. Volume 9, No. 4

Цели и задачи журнала

Научно-производственный рецензируемый журнал «**Разработка и регистрация лекарственных средств**» – актуальное бесплатное ежеквартальное прикладное издание и информационный портал для специалистов, задействованных в сфере обращения лекарственных средств. Журнал предназначен для фармацевтических предприятий-производителей и их сотрудников из отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития; сотрудников лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений. Основная цель журнала – обобщение научных и практических достижений в сфере разработки и регистрации лекарственных средств, повышение научной и практической квалификации специалистов сферы обращения лекарственных средств. Основные **пять тематических разделов** журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» включают цикл развития лекарственного средства от его создания до получения регистрационного удостоверения.

Первый раздел посвящен поиску и разработке новых лекарственных средств/

Второй раздел – 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 методик, 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.

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

Вартаньянц И. А., проф., к. ф.-м. н., профессор Deutsches Elektronen-Synchrotron, Гамбург, Германия

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

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

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

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

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., заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2, ООО «ЦФА», Москва, Россия

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

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

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

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

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

Мирошниченко И. И., д. м. н., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия

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 ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 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 Иванэ Джавахишвили, Тбилиси, Грузия

Сысуев 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

Тринеева О. В., д. фарм. н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Чучалин В. С., д. фарм. н., заведующий кафедрой фармацевтической технологии, декан фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

Эпштейн Н. А., к. х. н., зав. лабораторией Центра регистрации и разработки лекарственных средств ООО «Ирвин 2», Москва, Россия

Учредители печатной версии	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Учредители онлайн версии	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Издатель	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Основан	Журнал издается с ноябрь 2012 г.
Периодичность	4 выпуска в год
Префикс DOI	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Адрес редакции	Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА») Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3. Тел.: +7 (499) 281-81-11 www.pharmjournal.ru e-mail e-mail: info@pharmjournal.ru
Адрес типографии	ООО «МАКС ПРЕСС» Россия, 141092, Московская область, г. Королев, микрорайон Юбилейный, ул. Парковая, д. 2, кв. 103
Копирайт	© Разработка и регистрация лекарственных средств, 2020
Условия распространения материалов	Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License 
Тираж	999 экземпляров
Цена	Свободная

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

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 section 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.

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

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

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

Ivan A. Vartanants, Prof., Cand. of Sci., Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Print version founders	LC 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	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA») Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Publisher	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA») Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
Founded:	The journal has been published since November 2012.
Frequency	Quarterly
DOI Prefix	10.33380
ISSN print	2305-2066
ISSN online	2658-5049
Editorial office address	LC Center of Pharmaceutical Analytics (LLC «CPHA») Address: 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia Phone: +7 (499) 281-81-11 www.pharmjournal.ru e-mail e-mail: info@pharmjournal.ru
Printing house address	LLC «MAX PRESS» 2/103, Parkovaya str., Yubileyny microdistrict, Korolev, Moscow region, 141092, Russia
Copyright	© Drug development & registration, 2020
Content distribution terms	Content is distributed under Creative Commons Attribution 4.0 License 
Circulation	999 copies
Price	Free

The journal is included in the List of peer-reviewed scientific publications, in which the main scientific results of dissertations for the degree of candidate of science, for the degree of doctor of sciences should be published

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции	10
Практические рекомендации	11
Мероприятия	17
Поиск и разработка новых лекарственных средств	
Фазовые равновесия биологически активных систем 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофураксана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофураксана Л. М. Юсупова, А. Н. Хузиахметова, Е. Г. Горелова, В. К. Мингазова, И. В. Галкина	26
Изучение биологически активных твердофазных систем на основе галогензамещенных нитробензофураксанов методом ИК-спектроскопии А. Н. Хузиахметова, Е. Г. Горелова, Л. М. Юсупова, А. А. Курмаева	32
Нейтральные липиды плодов овса посевного (<i>Avena sativa</i> L.) Н. К. Юлдашева, С. Д. Гусакова, Д. Х. Нуруллаева, Н. Т. Фарманова, Р. П. Закирова, Э. Р. Курбанова	40
Фармацевтическая технология	
Технологические аспекты создания лекарственной формы оригинальной субстанции 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана Г. Э. Бркич, Н. В. Пятигорская, О. А. Зырянов, Н. Б. Дёмина, Е. О. Бахрушина, И. И. Краснюк	44
Анализ процесса измельчения в виброкавитационном гомогенизаторе Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич, О. М. Флисюк, Д. Ю. Ивкин	53
Новый подход к доставке лекарственных средств в офтальмологической практике: разработка композитного офтальмологического раствора для лекарственной нагрузки мягких контактных линз Д. К. Наплеков, Е. Т. Жиликова, А. Ю. Малютина, А. В. Бондарев, Н. Б. Демина, О. О. Новиков, Р. А. Абрамович	59
Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы О. Е. Клементьева, А. Б. Брускин, К. А. Лунёва, В. Б. Бубенчиков, К. Э. Терновская, А. С. Лунёв, Г. Е. Кодина	66
Влияние экстрагента разной концентрации на содержание биологически активных веществ в лекарственном препарате «Пустырника настойка» Е. П. Рогожникова, П. Г. Мизина, С. Г. Марданлы	72
Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Д. В. Демченко, Е. А. Джайн (Корсакова), В. Ю. Балабаньян, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров	79
Разработка терморевверсивного стоматологического геля с берберинном А. Г. Пальвинский, Е. О. Бахрушина, Ж. М. Козлова, А. А. Синицына, И. И. Краснюк	88
Методы анализа лекарственных средств	
Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического таннина в лекарственной форме Е. В. Игнатьева, И. В. Ярцева, З. С. Шпрах, И. Р. Просалкова, С. А. Сасов, О. Л. Орлова	93
Разработка и стандартизация карандашей лекарственных с эвкалимином К. Ю. Алешникова, В. Н. Дул, М. А. Джавахян, О. А. Семкина	99
Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения стероидного сапогенина диосгенина из семян пажитника сеного, <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. А. Е. Суханов, А. Н. Ставрианиди, Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк, О. В. Буюклинская	107
Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид Ю. М. Домнина, В. В. Суслов, Н. Э. Грамматикова, С. А. Кедик	116
Количественное определение бензалкония хлорида в составе назального спрея налтрексона гидрохлорида Ю. М. Домнина, В. В. Суслов, С. А. Кедик, Е. В. Ворфоломеева, А. В. Мелешко	121

Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор)	
Д. А. Козин, З. С. Шпрах, В. Ю. Решетняк, О. В. Нестерова, И. Н. Аверцева, Г. М. Родионова	128
Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты (обзор)	
А. Х. Амандусова, К. Р. Савельева, А. В. Морозов, В. А. Шелехова, Л. В. Персанова, С. В. Поляков, В. Н. Шестаков	136
Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ	
А. М. Суханова, И. Б. Перова, К. И. Эллер, Г. М. Родионова, С. В. Чернова, В. Н. Кузина	141
Доклинические и клинические исследования	
Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС	
Т. Н. Комаров, И. Е. Шохин, М. А. Токарева, О. А. Арчакова, Д. С. Богданова, А. В. Алешина, Н. С. Багаева, В. В. Давыданова, Н. П. Садчикова	146
Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап АМ® (телмисартан/амлодипин) и совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан) и Норваск® (амлодипин) с участием здоровых добровольцев	
В. Кубеш, А. Л. Хохлов, А. М. Шитова, Ю. А. Джурко, В. И. Казей, А. А. Хохлов, А. Е. Мирошников, О. В. Лебедева, И. К. Клаус, А. В. Зятенков	155
Регуляторные вопросы	
Обязанности держателей регистрационных удостоверений в части соблюдения правил GMP (обзор)	
А. П. Мешковский, Н. В. Пятигорская, Ж. И. Аладышева, В. В. Береговых, А. М. Пятигорский, Н. С. Николенко, М. М. Маршалова, В. В. Беляев	164
Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств	
А. Е. Феофилова, А. В. Фотеева, Н. Б. Ростова	171
Примеси N-нитрозаминов в лекарственных средствах: токсичность, пути образования, методы определения и нормирование (обзор)	
П. П. Щетинин, С. П. Сенченко, К. К. Гордеев	180

CONTENTS

Introduction	10
Practical recommendations	11
Events	17
Research and development of new drug products	
Phase Equilibrium of Biologically Active Systems 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxane and 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxane Luiza M. Yusupova, Alsu N. Khuziakhmetova, Elena G. Gorelova, Venera K. Mingazova, Irina V. Galkina	26
Study of Biologically Active Solid-phase Systems Based on Halogen-substituted Nitrobenzofuroxans by the IR Spectroscopy Method Alsu N. Khuziakhmetova, Elena G. Gorelova, Luiza M. Yusupova, Alina A. Kurmaeva	32
Neutral Lipids of Oats Fruit (<i>Avena Sativa</i> L.) Nigora K. Yuldasheva, Svetlana D. Gusakova, Dilobar Kh. Nurullaeva, Nodira T. Farmanova, Rano P. Zakirova1, Elvira R. Kurbanova	40
Pharmaceutical Technology	
Technologic Considerations of Creation Dosage Form of Original Substance 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane Galina E. Brkich, Natalia V. Pyatigorskaya, Oleg A. Zyryanov, Natalia B. Demina, Elena O. Bakhrushina, Ivan I. Krasnyuk	44
The Analysis of Process of Crushing in the Vibrocavitational Homogenizer Elena V. Flisyuk, Sergey S. Belokurov, Igor A. Narkevich, Oleg M. Flisyuk, Dmitry Yu. Ivkin	53
New Approach to Drug Delivery in Ophthalmological Practice: Development of Composite Ophthalmological Solution for Drug Loading of Soft Contact Lenses Denis K. Naplekov, Elena T. Zhilyakova, Anastasiya Yu. Malyutina, Aleksander V. Bondarev, Natalia B. Demina, Oleg O. Novikov, Rimma A. Abramovich	59
Development of Radiopharmaceutical Composition for Radionuclide Diagnostics of Malignant Melanoma Olga E. Klementyeva, Alexander B. Bruskin, Kristina A. Lunyova, Viktor B. Bubenshchikov, Kristina E. Ternovskaya, Aleksandr S. Lunev, Galina E. Kodina	66
Effect of Different Extractant Concentrations on the Content of Biologically Active Substances in Motherwort Tincture Elena P. Rogozhnikova*, Praskovya G. Mizina, Saifuddin G. Mardanly	72
Development and Biopharmaceutical Evaluation of Tablets Based on the Poorly Water-soluble Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil Dmitry V. Demchenko, Ekaterina A. Jain (Korsakova), Vadim Yu. Balabanyan, Marina N. Makarova, Valerij G. Makarov	79
Development of Thermoreversible Dental Gel with Berberine Artemiy G. Palvinskiy, Elena O. Bakhrushina, Zhanna M. Kozlova, Anastasiia A. Sinitsyna, Ivan I. Krasnyuk	88
Analytical Methods	
Development and Validation of Dimeric Macrocyclic Tannin Assay Method in Dosage Forms Elena V. Ignateva, Irina V. Yartseva, Zoya S. Shprakh, Irina R. Prosalkova, Sergei A. Sasov, Olga V. Orlova	93
Development and Standardization of Crayons with Eucalimine Kristina Yu. Aleshnikova, Vyacheslav N. Dul, Marina A. Dzhavakhyan, Olga A. Semkina	99
Validation of the HPLC-UV Method for Quantitative Determination of Steroid Sapogenin Diosgenin from Hay Fenugreek Seeds, <i>Trigonella Foenum-graecum</i> L. Anton E. Sukhanov, Andrey N. Stavrianidi, Elena D. Kubasova, Alexandra S. Panasyuk, Olga V. Buyuklinskaya	107
Microbiological Estimation of Nasal Spray Containing Naltrexone Hydrochloride Yuliya M. Domnina, Vasilij V. Suslov, Nataliya E. Grammatikova, Stanislav A. Kedik	116

Quantitative Determination of Benzalconium Chloride in the Naltrexone Hydrochloride Nasal Spray Yuliya M. Domnina, Vasiliy V. Suslov, Stanislav A. Kedik, Elena V. Vorfolomeeva, Anastasiya V. Meleshko	121
Indolo[2,3-a]carbazole Derivatives with Antitumor Activity and Instrumental Methods for Their Investigation (Review) Dmytry A. Kozin, Zoya S. Shprakh, Vladimir Yu. Reshetnyak, Olga V. Nesterova, Irina N. Avertseva, Galina M. Rodionova	128
Physical and Chemical Properties and Quality Control Methods of Hyaluronic Acid (Review) Akzhvek Kh. Amandusova, Kristina R. Saveleva, Andrei V. Morozov, Vera A. Shelekhova, Lyudmila V. Persanova, Sergei V. Polyakov, Vladislav N. Shestakov	136
Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis Anna M. Sukhanova, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller, Galina M. Rodionova, Svetlana V. Chernova, Vera N. Kuzina	141
<i>Preclinical and clinical study</i>	
Development and Validation of Pomalidomide Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS Method Timofey N. Komarov, Igor E. Shohin, Margarita A. Tokareva, Olga A. Archakova, Dana S. Bogdanova, Alexandra A. Aleshina, Natalia S. Bagaeva, Veronika V. Davydanova, Natalia P. Sadchikova	146
Pharmacokinetic and Bioequivalence Study of Telzap AM® (Telmisartan/amlodipine Fixed-dose Combination) and Coadministered Mikardis® (Telmisartan) and Norvask® (Amlodipine) in Healthy Subjects Vladimir Kubesh, Alexander L. Khokhlov, Anastasia M. Shitova, Yuri A. Dzhurko, Vasily I. Kazey, Alexander A. Khokhlov, Alexey E. Miroshnikov, Olga V. Lebedeva, Inga K. Klaus, Alexey V. Zyatenkov	155
<i>Regulatory Issues</i>	
Responsibilities of the Marketing Authorisation Holders in Respect of GMP Compliance (Review) Andrei P. Meshkovskiy, Natalia V. Pyatigorskaya, Zhanna I. Aladysheva, Valery V. Beregovykh, Alexander M. Pyatigorskiy, Natalia S. Nikolenko, Marina M. Marshalova, Vasiliy V. Belyaev	164
The Modern Concepts of Pharmaceutical Development in the Context of the Transition to a Uniform Regulation of Medicinal Products Circulation Anna E. Feofilova, Alexandra V. Foteeva, Natalya B. Rostova	171
N-nitrosamine Impurities in Medicines: Toxicity, Formation Pathways, Methods of Determination, and Limits (Review) Petr P. Shchetinin, Sergey P. Senchenko, Konstantin K. Gordeev	180



Приглашаем принять участие
в научно-практической конференции

**ЕЖЕГОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»**

Конференция состоится 11 декабря 2020 года с 11:00 до 16:00
по московскому времени в онлайн-формате на платформе Zoom

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас принять участие в традиционной ежегодной бесплатной научно-практической конференции с международным участием «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследования препаратов в условиях пандемии Covid-19». В этом году конференция пройдет в онлайн-формате.

В рамках конференции будут рассмотрены актуальные аспекты разработки, а также доклинических и клинических исследований оригинальных, воспроизведенных, гибридных и биоаналогичных лекарственных средств, включая препараты, актуальные в условиях пандемии коронавирусной инфекции.

Докладчиками конференции являются ведущие специалисты отрасли, представляющие научные организации, регуляторные органы и промышленность.

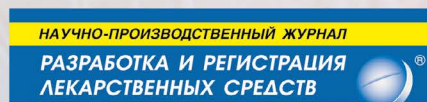
Ссылка для подключения к онлайн-конференции будет направлена зарегистрированным слушателям накануне конференции.



Зарегистрироваться



**Генеральный
информационный партнер**



Спонсор



При поддержке

ERWEKA



SARTORIUS



Agilent
Trusted Answers

АВРОРА
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ



Анализ препаратов, вызывающих лекарственную зависимость, методом ЖХ-МС с использованием колонок Agilent Poroshell HPH C18 при низких и высоких значениях pH подвижной фазы

Методические рекомендации

АВТОРЫ

Уильям Лонг (William Long),
Agilent Technologies, Inc.

*Низкомолекулярные
лекарственные препараты*

ВВЕДЕНИЕ

В данных методических рекомендациях рассмотрен анализ нескольких соединений, относящихся к препаратам, вызывающим лекарственную зависимость, методом ЖХ-МС с использованием универсальной градиентной методики и масс-спектрального детектирования с ионизацией распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов (ESI+) при высоких и низких значениях pH подвижной фазы. Обычно предполагается, что зарядовое состояние молекул аналита зависит от значения pH подвижной фазы. При этом эффективность ионизации в методе ЖХ-МС с ионизацией распылением в электрическом поле в режиме положительно заряженных ионов будет значительно ниже при использовании подвижных фаз с высоким значением pH вследствие перехода соединений в незаряженные формы. Однако многие исследователи в процессе изучения различных видов проб (включая белки, пептиды и аминокислоты) обнаруживали отсутствие эффекта от увеличения pH подвижной фазы или даже увеличение чувствительности [1–6]. Использование подвижных фаз с высоким значением pH не подавляет ионизацию основных соединений при ионизации распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов. Положительно заряженных ионов образуется достаточно много, а полученные сигналы аналита при использовании подвижных фаз с высоким pH часто даже лучше, чем в случае кислотных подвижных фаз с низким pH. Это важное заключение позволяет распространить применение универсальных методик элюирования на анализ полярных основных соединений, в отношении удерживания которых ранее встречались затруднения.

Однако, как было показано, многие из тех условий хроматографического разделения, которые мо-

гут быть использованы при высоких значениях pH, оказывают вредное воздействие на стандартные колонки для ВЭЖХ с сорбентами на основе силикагеля. Использование новых колонок Agilent Poroshell HPH C18, которые устойчивы к средам с высоким значением pH, позволяет регулировать селективность и чувствительность за счет контроля значения pH без сокращения срока службы колонки при повышенных величинах pH. Колонки с поверхностно-пористыми частицами находят все более широкое применение благодаря высокой эффективности и скорости. Исследователи теперь могут использовать растворы с более широким диапазоном значений pH при разработке хроматографических методик, использующих такие колонки [7].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данной работе использовали систему ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity с трехквadrupольным масс-спектрометром Agilent 6460, включающую следующие компоненты:

- двухканальный насос Agilent 1290 Infinity, обеспечивающий давление до 1200 бар (G4220A), модифицированный применением уплотнения из полиэфирэфиркетона (PEEK) в клапане байпаса растворителя (роторное уплотнение PEEK FL, кат. № 5068-0171);
- термостат колоночного отделения Agilent 1290 Infinity (TCC) (G1316C);
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A) с роторным уплотнением PEEK (роторное уплотнение PEEK FL, кат. № 5068-0170);
- колонка Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 мм, 4 мкм (кат. № 695970-502).

Уплотнения PEEK FL следует использовать с буферными растворами гидрокарбоната аммония. В серии приборов Agilent 1290 обычно используются ротор-

ные уплотнения из материала Vespel, которые подходят для растворов с диапазоном значений pH от 1 до 10. Роторные уплотнения PEEK FL выполнены из специальной смеси полиэфирэфиркетонов (PEEK), что позволяет использовать их в более широком диапазоне значений pH (от 1 до 12,5). Установка УВЭЖХ скомпонована на стойке A-line. Для минимизации дисперсии в системе были использованы капилляры с внутренним диаметром 0,075 мм. Обратное давление при использовании таких капилляров выше по сравнению со стандартными капиллярами с внутренним диаметром 0,12 или 0,17 мм. Но это не вызывает затруднений, поскольку колонка Poroshell HPH C18 с размером частиц 4 мкм порождает низкое обратное давление. В таблице 1 приведен перечень отслеживаемых MRM-переходов и ионов.

Таблица 1. MRM-переходы рассматриваемых соединений

Table 1. MRM transitions of the considered compounds

Соединение Compound	Родительский ион Parent ion	Напряжение на фрагментационной ячейке Fragmentation Cell Voltage	Дочерний ион 1 Child ion 1	Энергия соударений 1 Collision energy 1	Дочерний ион 2 Child ion 2	Энергия соударений 2 Impact energy 2
Стрихнин Strychnine	335,2	195	184	41	156	53
Алпразолам Alprazolam	309,1	179	281	25	205	49
Метилендиок- симетамфетамин (MDMA) Methylenedi- oxymethampheta- mine (MDMA)	194,1	97	163	9	105	25
Амфетамин Amphetamine	136,1	66	119,1	5	91	17
Тразодон Trazodone	372,2	159	176	25	148	37
Меперидин Meperidine	248,2	128	220,1	21	174,1	17
Верапамил Verapamil	455,3	158	165	37	150	45
Метадон Methadone	310,2	112	265,1	9	105	29
Проадифен Proadifen	354,2	153	167	29	91,1	45
Диазепам Diazepam	285,1	169	193	45	154	25
Тетрагидрокан- набинол (THC) Tetrahydrocan- nabinol (THC)	315,2	150	193,2	20	123,3	30

Буферные растворы со значением pH 3 были приготовлены из растворов формиата аммония и муравьиной кислоты с концентрацией 5 мМ. Формиат аммония приобрели в компании Sigma-Aldrich, Corp., а муравьиную кислоту двойной перегонки – в компании GFS. Для приготовления буферного раствора со значением pH 10,5 использовали гидрокарбонат аммония и гидроксид аммония компании Sigma-Aldrich.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение элюирования выбранных соединений при использовании основной и кислотной подвижных фаз позволяет сделать вывод о том, что при использовании основной подвижной фазы основные соединения удерживаются дольше. Основные соединения полностью протонированы и удерживаются лучше, чем заряженные соединения, в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Вследствие лучшего удерживания соединений расширяются возможности подбора растворителей, что позволяет увеличить расстояния между пиками на хроматограмме (рисунок 1). На рисунке 1 представлены сведения о градиенте и подвижной фазе. Также в случае использования основной подвижной фазы некоторые пики анализов получаются более интенсивными, чем с кислотной подвижной фазой. Пики, соответствующие тразодону, верапамилу, метадону и проадифену, значительно интенсивнее при использовании основной подвижной фазы. Это может быть вызвано как влиянием pH среды, так и тем, что соединение дольше удерживается и элюируется при большем содержании органического компонента в подвижной фазе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было продемонстрировано, что колонки Agilent Poroshell HPH-C18 подходят для длительного использования (более 2000 вводов пробы) при применении подвижных фаз с высокими значениями pH, например буферного раствора гидрокарбоната аммония (pH 10). Таким образом, благодаря использованию колонок с поверхностно-пористыми частицами, при разработке хроматографических методик исследователи могут применять растворы с более широким диапазоном значений pH. Такие колонки получают все большее распространение вследствие высокой эффективности и скорости. Применение поверхностно-пористых частиц совместно с подвижными фазами с высокими значениями pH является целесообразным и обладает существенными преимуществами [8].

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Chirita-Tampu R., West C., Fougere L., Elfakir C. Advantages of HILIC Mobile Phases for LC-ESI-MS-MS Analysis of Neurotransmitters. *LCGC Europe*. 2013;26:128–140.
- Nguyen H. P., Schug K. A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications. *J. Sep. Sci.* 2008;31:1465–1480.
- Zhou S., Cook K. D. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-wayround or right-way-round? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2000;11:961–966.
- Boyes B. E. Separations and Analysis of Peptides at High pH. *4th WCBP, San Francisco Ca.* 2000.
- Kuhlmann F. E., Apffel A., Fischer S. M., Goldberg G., П. Goodley P. Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by

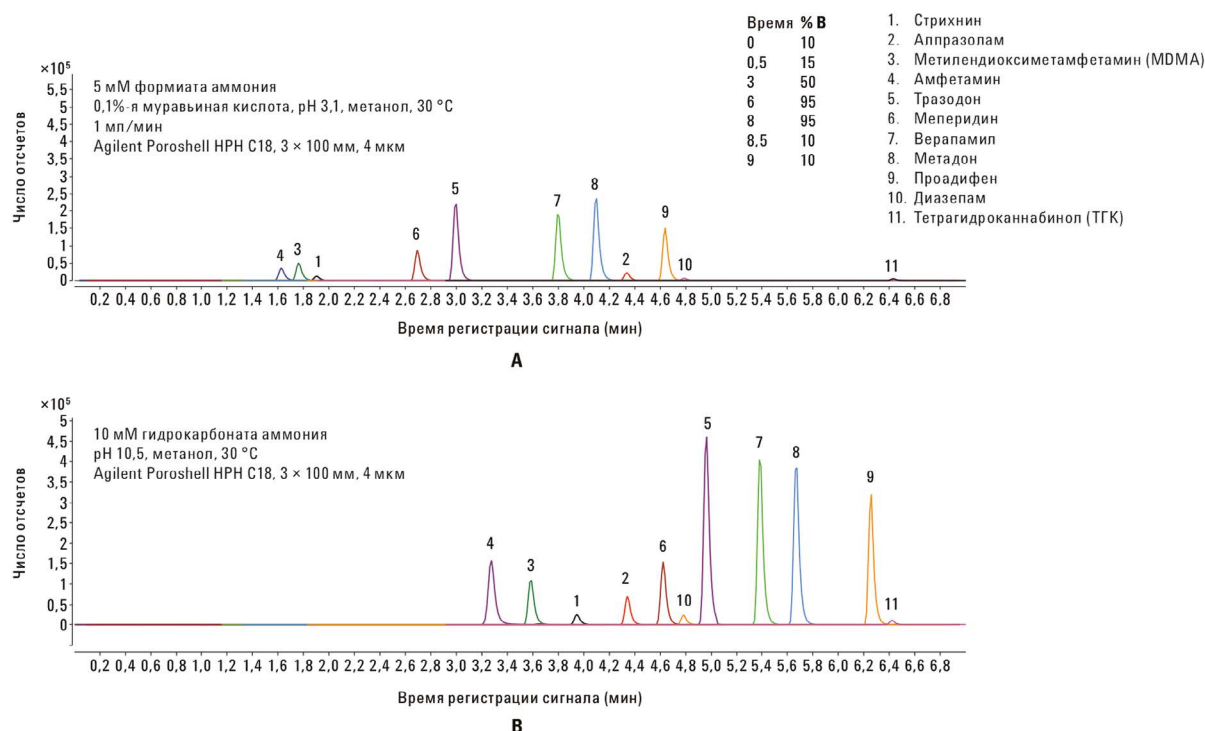


Рисунок 1. Разделение в средах с низкими и высокими значениями pH с использованием колонки Agilent Poroshell HPH C18 с размером частиц 4 мкм

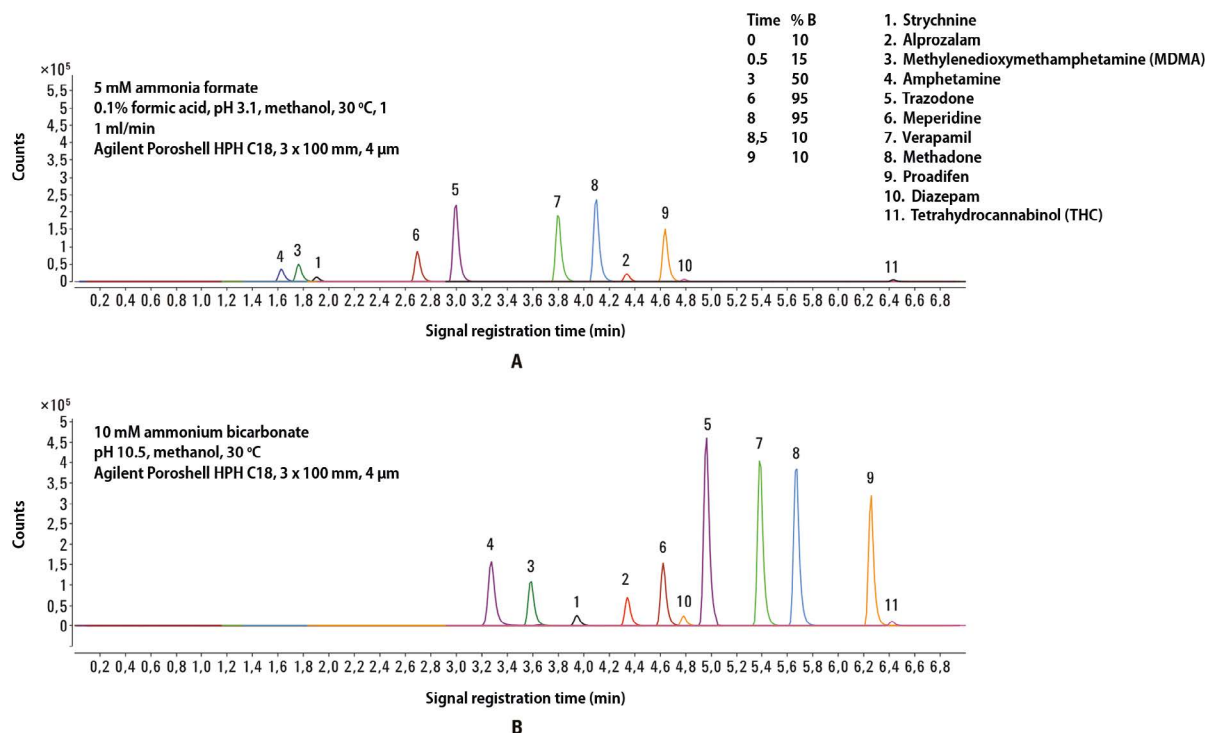


Figure 1. Separation in low and high pH media using an Agilent Poroshell HPH C18 4 μm column

- postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995, 6, 1221–1225.
- Mallet C. R., Lu Z., Mazzeo J. R. Rapid Commun A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solidphase extracts. *Mass Spectrom.* 2004;18: 49–56.
- Long W. J., Mack A. E., Wang X., Barber W. E. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using HighpH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC.* 2015;33(4).
- Mack A. E., Evans J. R., Long W. J. Fast Analysis of Illicit Drug Residues on Currency using Agilent Poroshell 120. *Agilent Technologies, Inc.* 2010. 5990-6345EN.



Камеры тестирования на стабильность PharmaEvent

Надежное хранение – безотказное испытание

Материал предоставлен
компанией ХИММЕД

Камеры тестирования на стабильность PharmaEvent от Weiss Pharmatechnik были специально разработаны согласно требованиям испытательных лабораторий в фармацевтической промышленности. Системы контроля камер PharmaEvent обеспечивают максимальную надежность хранения для определения срока годности фармацевтических веществ и соответствуют нормативным требованиям, включая мониторинг, калибровку и квалификацию.

Благодаря серии PharmaEvent компания Weiss Pharmatechnik разработала системы тестирования на стабильность, которые полностью отвечают высоким требованиям к точности, надежности и воспроизводимости. Спектр варьируется от лабораторных устройств до проходных климатических камер и контейнеров большого объема.

КАМЕРЫ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ

Камеры стабильности PharmaEvent доступны в четырех размерах (280, 600, 1300 и 2000 литров) (рисунок 1). Температура регулируется в диапазоне от +2 °C до 70 °C и оптимизирована к значениям ICH, относительная влажность регулируется от 20 % до 90 %. Оборудование также оптимизировано для непрерывной работы при температуре 5 °C без необходимости циклов оттаивания.

Необходимая относительная влажность воздуха создается с помощью запатентованной системы увлажнения паром (Sterile Steam System), при этом вводимая вода стерильно испаряется при 140 °C. Измерение влажности производится с помощью емкого датчика влажности.

КАМЕРЫ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ

Камеры фотостабильности PharmaEvent доступны в размерах 250 и 500 л (рисунок 2). Они отличаются идеальным и однородным распределением света,



Рисунок 1. Камеры стабильности PharmaEvent – соответствуют GMP и FDA

Figure 1. PharmaEvent stability chambers – GMP and FDA compliant

ультрафиолетового излучения, температуры и влажности с диапазоном температур от 5 °C до 50 °C и относительной влажностью от 20 % до 90 %, а также интенсивностью света макс. 2500 люкс.

Благодаря однородному распределению света образцы подвергаются равномерному воздействию при тестировании, что существенно снижает процент брака, а следовательно позволяет использо-



Рисунок 2. Камеры фотостабильности PharmaEvent отличаются идеальным распределением света, ультрафиолетового излучения, температуры и влажности. Они позволяют проводить испытания на фотостабильность менее чем за 100 часов

Figure 2. PharmaEvent photostability cameras are characterized by ideal distribution of light, UV radiation, temperature and humidity. They enable photostability testing in less than 100 hours

вать меньшее количество образцов для проведения испытаний.

Используемые осветительные устройства соответствуют требованиям стандарта ICH Q1B, вариант 2 и позволяют проводить тесты на фотостабильность менее чем за 100 часов. Эта система может быть снабжена соответствующими датчиками света и УФ-излучения для регистрации освещенности и УФ-излучения.

ПРОХОДНЫЕ КАМЕРЫ СТАБИЛЬНОСТИ

Проходные камеры стабильности PharmaEvent доступны как стандартные решения объемом от 10 до 100 м³ (рисунок 3). Кроме того, могут быть изготовлены практически любые специальные размеры, которые благодаря модульной конструкции могут быть оптимально адаптированы к пространственным условиям на месте установки.

Рабочий диапазон камер: температура – от +20 °C до +45 °C, относительная влажность – от 20 % до 80 % при температурах в точках росы от 9 °C до 41 °C. Возможны также расширения температурных и климатических диапазонов.

КЛИМАТИЧЕСКИЙ КОНТЕЙНЕР

Новые передвижные контейнеры для кондиционирования воздуха PharmaEvent – простое и удобное решение, позволяющее в короткие сроки расширить возможности хранения при испытании на стабильность. Контейнеры состоят из полноценной камеры для проведения высокоточных испытаний температуры и влажности, шлюза, системы циркуляции воздуха и шкафа управления всей электро-



Рисунок 3. Проходные камеры стабильности (большого объема) PharmaEvent подходят для испытаний на стабильность в соответствии с рекомендациями ICH Q1A

Figure 3. PharmaEvent stability chambers (large volume) are suitable for stability testing according to ICH Q1A guidelines



Рисунок 4. Мобильные климатические контейнеры PharmaEvent представляют собой полноценные испытательные камеры для испытаний на стабильность лекарственных средств и активных ингредиентов в соответствии со стандартами

Figure 4. PharmaEvent mobile climatic containers are complete test chambers for testing the stability of drugs and active ingredients in accordance with standards

ной. Для ввода в эксплуатацию требуется только место для установки и соответствующее электрическое подключение. Они доступны с объемом испытательной камеры 18 м³ и 47 м³.



Рисунок 5. Много места для хранения образцов. Температура регулируется потолочным испарителем со встроенным электрообогревателем и холодильным агрегатом с воздушным охлаждением

Figure 5. Plenty of storage space for samples. Temperature controlled by ceiling-mounted evaporator with built-in electric heater and air-cooled chiller



Рисунок 6. Регулирование и управление системами контроля камер стабильности PharmaEvent осуществляется с помощью проверенной системы управления S! MPAC и панели управления WEBSeason® Pharma, соответствующей требованиям GMP

Figure 6. PharmaEvent stability chamber control systems are regulated and controlled using the proven control system S! MPAC and GMP Compliant WEBSeason® Pharma Control Panels

Температура в испытательной камере климат-контейнера регулируется в диапазоне от +20 до +45 °C при относительной влажности от 20 % до 80 %. Допуски составляют всего от $\pm 0,5$ до 1 K или же от ± 1 до 3 % относительной влажности.

ВАРИАНТЫ ДОКУМЕНТАЦИИ, КВАЛИФИКАЦИИ, КАЛИБРОВКИ

Благодаря широкому спектру вариантов системы контроля устойчивости серии PharmaEvent могут быть адаптированы к индивидуальным требованиям. Пакет программного обеспечения S! MPAC Pharma, отвечающий требованиям FDA 21 CFR Part 11 и EU GMP Annex 11, доступен для полной и защищенной от каких-либо манипуляций документации испытаний стабильности в соответствии с национальными и международными спецификациями. По запросу также доступны исчерпывающие квалификационные документы, включая FAT, DQ, IQ, OQ и PQ в соответствии с GAMP 4 или проверочные документы в соответствии с GAMP 5. Услуги Weiss Pharmatechnik включают в себя выполнение квалификации или переквалификации, а также калибровку испытательных систем на заводе или локально у заказчика.

Дополнительную информацию Вы можете найти на сайте www.weiss-technik.com.

XI Практическая конференция «Pharmabrand-2020. Стратегии продвижения фармацевтических товаров и брендов»

14 сентября 2020 в конференц-зале отеля Radisson Collection Hotel в Москве состоялась XI Практическая конференция «Pharmabrand-2020. Стратегии продвижения фармацевтических товаров и брендов». Мероприятие собрало на одной площадке более 100 делегатов, директоров по маркетингу и рекламе, бренд- и продакт-менеджеров российских и международных фармкомпаний.



Партнерами конференции стали: компания мультимедийного продвижения фармбрендов Breffi, юридическая компания Lidings, системный интегратор Navicon, programmatic платформа MediaSniper, рекламное агентство «РОССТ», а также разработчик цифровых технологий, компания Way2Win Group. Информационную поддержку конференции оказывали более 20 фармацевтических ассоциаций и ведущих профильных СМИ.

Деловая программа конференции началась с Юридического бизнес-завтрака «Сессии вопросов и ответов», посвященного правовым аспектам продвижения фармпрепаратов. Спикеры сессии, представители компании Lidings, **Борис Малахов** (партнер, руководитель практики Интеллектуальной собственности) и **Розалина Тер-Аветикян** (младший юрист) рассказали участникам мероприятия о законодательных тонкостях регулирования продвижения фармпрепаратов, а также о том, как легитимно продвигать фармацевтические товары посредством вебсайтов, блогов и социальных сетей. Так, по словам **Бориса Малахова**, реклама – это информация, распространенная любым из способов, и новые digital-каналы не являются исключением, а потому фарммаркетологам необходимо внимательнее относиться к требованиям законо-

дательства, будь то публикация на сайте или пост в Инстаграм.

Продолжило деловую программу мероприятия Case-study от директора по продажам в компании Miele **Сергея Кабанова** на тему «Ключевые различия в продажах FMCG и фармбрендов. 5 идей FMCG рынка, которые будут точно полезны для продвижения фармбрендов». В качестве пяти идей, которые используются в FMCG-маркетинге и могут быть взяты на вооружение в фарме, спикер выделил: Wow-рекламу, наличие адвокатов бренда/блогеров, использование социальных сетей, интернет-продажи (с акцентом на работе с аудиторией) и маркетплейсы.

И еще одним ярким событием конференции стала Challenge-сессия «Путь героя – 12 шагов на пути к успеху вашего бренда». Ведущим сессии стал совладелец группы компаний Breffi, президент бизнес-клуба «Эквиум» **Евгений Гордеев**, компании которому составили приглашенные эксперты: **Андрей Алексеев** (руководитель отдела digital маркетинга «Петровакс»), **Алексей Деревягин** (к. э. н., эксперт по эконометрическому моделированию Breffi) и **Вячеслав Краснов** (менеджер по эффективности маркетинга STADA).

Участники сессии разобрали «обычный» фармацевтический бренд как «героя», который получает свое развитие в рамках продвижения. Во время его

«пути» друг друга сменяют различные подходы к формированию стратегии продвижения, используются инновационные инструменты, и открываются дополнительные возможности, которые нам предоставляют современные технологии.

Далее в рамках мероприятия состоялась Digital-экспертиза, специальная сессия, посвященная применению цифровых инструментов для продвижения фармацевтических товаров и брендов. В роли модератора выступил **Евгений Паперный**, возглавляющий направление медицинских информационных продуктов в Сбербанке. Сессия началась с аналитического вступления от **Олега Фельдмана**, сопредседателя направления Healthcare компании Ipsos в России, который подробно остановился на основных трендах и перспективах e-комм на ближайшее будущее в свете продолжающегося коронакризиса.

Вторая часть сессии была посвящена обсуждению различных кейсов продвижения фармпрепаратов. В число спикеров вошли: **Евгений Доронин** (генеральный директор MediaSniper), **Илья Народицкий** (директор по развитию инновационных решений Navicon) и **Глеб Похитонов** (руководитель отдела цифрового маркетинга «Гедеон Рихтер»). Так, **Илья Народицкий** выступил со злободневным докладом на тему «Маркетолог будет жить плохо, но недолго» и рассказал о важности смены парадигмы с «мы должны доставить контент» до «мы должны улучшить восприятие бренда». А **Евгений Доронин** разобрал кейс из собственного опыта в рамках Precision marketing подхода в социальных сетях, раскрыв особенности таргетинга и персонализации. Руководитель отдела цифрового маркетинга компании «Гедеон Рихтер» **Глеб Похитонов** поделился опытом своей компании по разработке большого количества презентаций для лекарственных средств (до 25 тысяч слайдов в год), рассказав о том, как перенос данного процесса из outsource в in-house помог сделать презентационные материалы компании интерактивными и при этом не слишком затратными.

Следующая сессия под названием «Работа с врачебной аудиторией: на что жалуетесь, доктор?» также состояла из двух частей: кейсовой и дискуссионной. Модератором обеих стал совладелец группы компаний Breffi **Евгений Гордеев**. Среди спикеров первой части: **Антон Бондаренко** (управляющий партнер Breffi), **Елена Быкова** (руководитель отдела рекламы «Полисорб»), **Максим Даабуль** (старший менеджер по развитию продукта Breffi), **Максим Кочержинский** (руководитель направления омниканального маркетинга STADA), **Виктор Лебедев** (менеджер по омниканальному маркетингу STADA) и **Татьяна Толстых** (руководитель направления маркетинга рецептурных препаратов «Акрихин»).

Во второй части сессии спикеры поделились нюансами продвижения фармацевтических брендов, вы-

бора контрагента и оценки результата. Так, директор по маркетингу «ПрофитМед» **Игорь Климанов** поделился опытом ускоренной диджитализации в условиях covid и работы с онлайн-консолидаторами и маркетинг-плейсами. А по словам **Анны Константиновой**, старшего менеджера по развитию цифровых технологий компании Pfizer, коронавирус является мощным катализатором многих бизнес-процессов: «Многие компании за последние полгода осознали, что действовать нужно сейчас, нельзя ждать идеального момента». В свою очередь, **Евгений Вышковский**, директор и основатель проекта Врачи РФ, поделился собственным видением эффективных методов взаимодействия с врачебной аудиторией: «Когда мы говорим о трендах, мы не гадаем, мы имеем возможность спрашивать врачей, что именно они хотят. По последнему опросу, ситуация следующая: в безусловных лидерах традиционные каналы получения информации – доклады на конференциях, электронная почта, справочники лекарств. Выглядит так, будто бы будет некоторый «откат» относительно ситуации до и во время локдауна».

Следующим блоком деловой программы стал авторский модуль от **Евгения Гордеева** (Breffi) и **Бориса Альхимовича** (совладелец RedDay) для бренд-менеджеров фармацевтических компаний на тему «Думай и действуй как предприниматель». По мнению спикеров, новая реальность, сформировавшаяся в течение последних месяцев, требует от бренд-менеджеров фармкомпаний быстро принимать решения, находить новые возможности, ставить цели и последовательно двигаться к их достижению. Среди основных «убийц» целей были названы: «Ждун» – я еще успею сделать; Противоречивые цели – употреблять алкоголь и заниматься спортом; «Индulгенция» – я устал и имею право этого не делать; «Цели-слоны» – такие большие, что не видно краев; «Цели, крадущие счастье» – правильные и убивающие; «Чужие цели».

Завершилась деловая программа конференции мастер-классом директора по маркетингу компании «Отисифарм» **Станислава Решетникова** на тему «Теория архетипов. Архетипические элементы личности». Спикер рассказал о том, как одна из самых необычных теорий XX века может быть применена современным маркетологом или рекламщиком в фарме.

Компания infor-media Russia благодарит всех делегатов конференции за активное участие. Будем рады новым встречам с вами на наших новых фарммероприятиях, ближайшим из которых станет конференция «Что происходит на рынке БАД?» (30 ноября 2020 г.).

Актуальный календарь фармацевтических конференций представлен на сайте infor-media Russia.

12-я конференция «Что происходит на фармацевтическом рынке?»

14 сентября 2020 г. в конференц-зале отеля Radisson Collection в Москве состоялась очередная, уже 12-я по счету, конференция «Что происходит на фармацевтическом рынке?», ставшая первым крупным посткарантинным фарммероприятием в России. Конференция собрала на одной площадке свыше 250 экспертов фармацевтического рынка, представителей ведущих производителей и дистрибьютеров, отраслевых ассоциаций, профильных министерств и ведомств, а также отраслевых и бизнес-СМИ.



Официальным партнером мероприятия стала Группа компаний САПРАН, специализирующаяся на внедрении ИТ решений для бизнеса. В роли партнера бизнес-завтрака выступило адвокатское бюро Forward Legal. В число партнеров мероприятия вошли: аналитическая компания AlphaRM, маркетинговое агентство DSM Group, производитель и поставщик технологических решений Sartorius и компания Курсор Маркетинг, осуществляющая мониторинг тендерных закупок лекарственных средств. Стратегическими партнерами мероприятия стали: информационно-логистический оператор Santens, маркетплейс прямых контактов PharmaSpace, IT-разработчик PharmaTrace и компания Sooplata 2.0, занимающаяся организацией программ лояльности.

Открывал деловую программу конференции бизнес-завтрак на тему «Топ-3 юридических риска для фармацевтического рынка». Спикеры бизнес-завтрака, представляющие компанию Forward Legal, **Ольга Ренова** (адвокат, управляющий партнер) и **Ольга Карпова** (адвокат, партнер), рассказали участникам мероприятия об особенностях работы с предупреждениями ФАС (закупка, реклама, ценовые прогнозы), возможностях обжалования актов Росздравнадзора через сайт госуслуг и путях предотвращения платежей и банкротств аптечных сетей. **Ольга Карпова** посоветовала присутствующим тщательнее вести экономические расчеты и обоснования деятельности компании, ведь именно они, по словам спикера, станут основным доводом в пользу того, что компания не принимала участия в картельном сговоре.

Основная программа мероприятия открылась пленарным заседанием, в рамках которого состоялся первый антикризисный штаб фармы «Экстренные

действия по выживанию и сохранению бизнеса и основные уроки Covid-19». Модераторами штаба стали **Николай Демидов** (генеральный директор IQVIA) и **Вадим Кукава** (исполнительный директор ассоциации «Инфарма»), а места спикеров заняли **Валентина Бучнева** (глава бизнес-подразделения «Евразия», «Босналек»), **Маттиас Вернике** (генеральный директор Merck в России и СНГ), **Илья Вольнов** (директор бизнес-направления ERP, SAPRUN), **Дмитрий Гордеев** (заместитель генерального директора по финансам и цепям поставок «Биокад»), **Анна Ермолаева** (генеральный директор ALPHA RESEARCH & MARKETING), **Рустем Муратов** (президент «Синтез», генеральный директор «Алиум»), **Дмитрий Погребинский** (генеральный директор ЦВ «Протек»), **Ольга Широкова** (руководитель направления сердечно-сосудистых заболеваний и базовых продуктов Sanofi) и **Сергей Шуляк** (генеральный директор DSM Group).

По словам **Вадима Кукавы**, в марте-апреле российский фармрынок испытал на себе настоящий шторм, связанный с взрывным ростом, когда население под влиянием пандемии резко начало увеличивать запасы лекарственных средств, после чего рынок продолжил развиваться в смягченной фазе пандемии. **Сергей Шуляк** одним из основных трендов постпандемийного периода назвал вымывание одиночных аптек с рынка. «Единственное, что позволяет небольшим сетям выживать и оставаться на рынке, это объединение в более крупные союзы», – подытожил спикер. **Валентина Бучнева** в свою очередь выразила уверенность в том, что только совместная работа всех участников цепочки поставок на фармрынке сможет принести положительный результат в столь непростое время.

Завершало пленарно заседание выступление **Дмитрия Багдея** (к. э. н., директор по продукту «Фарма Трэйс», автор книги «Матрица фарммаркировки 2.0.2.0. Производство и импорт ЛП») на тему «Сервисная логистика и тенденции развития новых сервисов в отрасли».

Следующим блоком деловой программы конференции стала сессия на Актуальную вирусную тему: «Covid-19 как основная угроза реализации национальных проектов в 2020 г.». В роли модератора выступил заместитель генерального директора по коммерческой деятельности компании «Джи Ди Пи» **Андрей Телятников**. В число спикеров сессии вошли: **Алексей Алехин** (директор Департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России), **Александр Быков** (директор по экономике здравоохранения «Р-Фарм»), **Екатерина Задонская** (генеральный директор «Курсор Маркетинг»), **Владимир Нестеренко** (генеральный директор «Аптечная сеть 36,6»), **Лариса Попович** (директор Института экономики здравоохранения НИУ ВШЭ), **Максим Стецюк** (исполнительный директор «Нанолек») и **Владимир Шипков** (исполнительный директор Ассоциации международных фармацевтических производителей, AIPM).

Далее в рамках деловой программы конференции состоялась сессия на тему «Новая методика ценообразования и ее влияние на рынок», модератором которой выступил **Иван Глушков**, заместитель генерального директора компании «Иммунотехнологии». Спикерами сессии стали: **Александр Волков** (заместитель директора Департамента – начальник отдела регистрации цен на жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты Минздрава России), **Виктор Дмитриев** (генеральный директор АРФП), **Ирина Иванищева** (директор по корпоративным связям и юридическим вопросам «АстраЗенека» Россия и Евразия), **Филипп Романов** (директор департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств Минздрава России) и **Лилия Титова** (исполнительный директор СПФО).

Темой следующей сессии стала «Национальная подушка безопасности. Производство субстанций в России – шаги на пути к импортонезависимости». Модерировал сессию **Александр Семенов**, президент компании «Активный Компонент», а в число спикеров вошли: **Алексей Алехин** (директор Департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России), **Олег Астафуров** (вице-президент по работе с государственными органами «Фармасинтез»), **Захар Голант** (председатель правления «Союза фармацевтических и биомедицинских кластеров России»), **Александр Мажуга** (ректор, РХТУ им. Д. И. Менделеева), **Инна Семенова** (генеральный директор «Активный Компонент»), **Вадим Тарасов** (директор института трансляционной медицины и биотехнологии, заведующий кафедрой Первого МГМУ им. И. М. Сеченова) и **Людмила Щербакова** (президент группы компаний Bright way).

По словам **Александра Семенова**, большинство стран, включая Россию, в первые месяцы панде-

мии столкнулись с дефицитом сырья фармсубстанций в связи с тем, что Индия и Китай были закрыты, и теперь активно прорабатывают шаги по снятию такого рода зависимости. По утверждению **Захара Голанта**, тридцатилетний период глобализации во всех без исключения сферах сегодня испытывает серьезное давление: «Сырьевые цепочки будут если не рваться, то по крайней мере пересматриваться. В этой связи вопрос сырьевой независимости для России является частью стратегии национальной безопасности».

Нашла свое отражение в деловой программе и ставшая весьма актуальной тема дистанционной торговли. Ей была посвящена отдельная дискуссионная сессия «Online & Softline: сепарация или эскалация?», модератором которой стала **Евгения Ламина** (коммерческий директор «Аптечная сеть 36,6»). Места спикеров заняли: **Даурен Абеуов** (начальник отдела электронной коммерции ЦВ «ПРОТЕК», «Здравсити»), **Андрей Алексеев** (руководитель отдела digital маркетинга «Петровакс»), **Нелли Игнатьева** (исполнительный директор РААС), **Игорь Климанов** (директор по маркетингу «ПрофитМед») и **Анатолий Тенцер** (руководитель проекта Apteka.ru).

Игорь Климанов выделил два основных последствия, вызванных пандемией локаута: увеличение спроса на дистанционные коммуникации с целевой аудиторией, а также рост востребованности digital-сервисов, которыми могут воспользоваться фармкомпании. По словам **Анатолия Тенцера**, дистанционная торговля, несмотря на нынешние обстоятельства, это по-прежнему считанные проценты среди других каналов продаж в фарме. «Вопреки ожиданиям, за прошедшие полгода рост дистанционной торговли за пределами городов-миллионников крайне мал», – заключил спикер. В аналогичном ключе высказался и **Андрей Алексеев** назвав Digital стратегически важным каналом, который необходимо планировать, в который нужно вкладывать время и деньги, чтобы в конечном итоге он принес отдачу.

Завершала деловую программу мероприятия сессия на тему «Очевидная вероятность: поможет ли цифровая трансформация выйти из кризиса и найти точки роста?». Модератором сессии стал **Андрей Алмазов** (директор по проектной деятельности Ассоциации «Национальная база медицинских знаний»), а места спикеров заняли: **Мария Литвинова** (исполнительный директор «СоюзФарма»), **Александр Мазуров** (директор по цифровой трансформации компании Sanofi), **Вадим Тарасов** (директор института трансляционной медицины и биотехнологии, заведующий кафедрой Первого МГМУ им. И. М. Сеченова) и **Максим Фролов** (заведующий лабораторией фармаэкономики, цифровой медицины и искусственного интеллекта «ВолгГМУ»).

Компания infor-media Russia благодарит всех делегатов конференции за активное участие. Будем рады новым встречам с вами на наших новых фарммероприятиях, ближайшим из которых станет конференция «Что происходит на рынке БАД?» (30 ноября 2020 г.). Актуальный календарь фармацевтических конференций представлен на сайте infor-media Russia.

«Аналитика Экспо 2020»: рекорды посещаемости на фоне растущих запросов рынка

С 22 по 25 сентября 2020 года в МВЦ «Крокус Экспо» прошла 18-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо».



Более 100 российских и зарубежных компаний представили свою продукцию профессиональным посетителям из фармацевтической, химической, пищевой, нефтегазовой, металлургической и других отраслей промышленности. Высокий уровень организации выставочного пространства, обновлённая концепция застройки стендов и оформления контент-зон, а также объективный запрос рынка на оборудование для проведения лабораторных исследований способствовали впечатляющему успеху выставки «Аналитика Экспо 2020».

В контексте текущей эпидемиологической обстановки значимость деятельности лабораторий в борьбе с коронавирусом постоянно повышается: в 2020 году, по оценке специалистов, российский рынок лабораторной диагностики находится на подъёме и продолжает расти, несмотря на сложную экономическую ситуацию. Выставка «Аналитика Экспо 2020» стала площадкой для демонстрации новинок лабораторного оборудования и материалов, проведения прямых переговоров с производителями и поставщиками, принятия решения о закупках. Об актуальности выставки свидетельствует заметно возросшая **плотность посетителей и их качественный состав, неоднократно отмеченный участниками**. Свои производственные задачи пришли решить руководители, инженеры, технологи, специалисты научно-исследовательских институтов, научных и производственных лабораторий. Большинство участников при подготовке к выставке отдали предпочтение улучшенным и индивидуальным стендам, что сделало экспозицию привлекательной для посетителей, способствовало личной коммуникации и облегчало демонстрацию

оборудования. После длительного периода ограничений офлайн-формат «Аналитика Экспо» в очередной раз доказал свои неоспоримые преимущества, в том числе для восстановления старых деловых контактов и приобретения новых связей. Поэтому закономерным является тот факт, что 92,4 % компаний уже подписали договоры на участие в выставке 2021 года, причём многие из них решили увеличить площадь своих стендов.

Организаторы, в свою очередь, приветствовали высокий уровень подготовки экспонентов к выставке. В завершающий день «Аналитика Экспо», 25 сентября, состоялось торжественное награждение участников за эффективную работу на площадке. **Наталья Медведева**, портфельный директор компании Huve Group, в приветственной речи поздравила собравшихся с успешно состоявшейся выставкой, особо отметив, что все 4 дня на стендах кипело живое общение, которого не хватало бизнесу последние полгода. Приглашённые эксперты **Николай Карасёв**, генеральный директор АВК «ЭкспоЭффект»; **Виктория Шухат**, бизнес-тренер, коуч; **Евгения Мануковская**, руководитель и основатель агрегатора деловых событий Ехромар, независимо от организаторов и друг от друга выполнили обход экспозиции и выделили победителей в пяти номинациях:

- ✓ В номинации «Креативный подход к оформлению стенда, привлекающий внимание посетителей» победила компания «Охаус».
- ✓ В номинации «Эффективная работа персонала на стенде» победила компания «Альфа Лаб».
- ✓ В номинации «Информативные презентации и демонстрации оборудования на стенде» победила компания «Мелитек».



- ✓ В номинации «Отлично продуманное расположение экспонатов на стенде» победила компания «Вибротехник».
- ✓ В номинации «Эффективные визуальные коммуникации» победила компания «Сарториус».

В тот же день, при поддержке департамента по взаимодействию с госструктурами Нуве Групп, **Наталья Медведева** и **Марина Челах**, директор «Аналитика Экспо», провели VIP-тур по выставке с делегатами из Японии. Позже состоялись переговоры по вопросу участия представителей Японии с национальным стендом в выставке «Аналитика Экспо 2021». В делегации участвовали представители экономического департамента посольства **Японии Ёсида Тору** и **Хирата Юмие**.



Деловая программа

В 2020 году деловая программа «Аналитика Экспо» проходила в двух открытых конференц-залах. Такое решение позволило участникам и посетителям сохранять контакт и оставаться в атмосфере прямого общения.

Всего в рамках деловой программы состоялось 14 мероприятий. Впервые на «Аналитика Экспо 2020» были организованы 2 прямые онлайн-трансляции, которые можно было посмотреть на YouTube-канале выставки, а также непосредственно на площадке. Такое решение позволило увеличить охват аудитории, пре-

доставив возможность большему количеству желающих прослушать деловую программу с соблюдением правил социального дистанцирования. Общее количество зрителей составило почти 1500 человек.

Одним из ключевых мероприятий деловой программы «Аналитика Экспо 2020» стало пленарное заседание «Актуальные вопросы обеспечения единства измерений». В заседании, которое состоялось 23 сентября, приняли участие представители госструктур и научного сообщества: **Елена Саратцева** (заместитель руководителя «Роскачество»), **Сергей Голубев** (заместитель руководителя «Росстандарт»), **Дмитрий Гоголев** (заместитель руководителя «Росаккредитация»), **Антон Пронин** (и. о. генерального директора ВНИИ метрологии им. Д. И. Менделеева), **Илья Красавин** (руководитель Центра мониторинга и прогнозирования ВНИИМС). К заседанию с видеообращением присоединился Вячеслав Бурмистров, начальник департамента Минпромторга России. Партнёрами мероприятия выступили АНО «Роскачество» и Ассоциация «РОСХИМПРЕАКТИВ».

Деловая программа «Аналитика Экспо» прошла при экспертной поддержке партнёров выставки: ФБУ «РОСТЕСТ-Москва», Научного Совета по аналитической химии РАН, Всероссийского НИИ метрологии им. Д. И. Менделеева, ВНИИ метрологической службы, Ассоциации «РОСХИМПРЕАКТИВ», Российского Союза химиков, НТЦ «Химвест» Минпромторга России, ААЦ «Аналитика», ГК «Виалек», ФАУ «Национальный институт аккредитации».

Организаторы «Аналитика Экспо», группа компаний Нуве, ответственно подошли к вопросу безопасности и охраны здоровья участников, посетителей и персонала. На площадке соблюдались все правила, установленные Роспотребнадзором РФ и Всемирной ассоциацией выставочной индустрии (UFI).

Спонсором выставки выступила компания «Энерголаб».

В 2021 году 19-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов «Аналитика Экспо» состоится с 13 по 16 апреля в МВЦ «Крокус Экспо» (м. Мякинино).



OPENBIO-2020: новейшие сибирские разработки для борьбы с коронавирусом

С 27 по 30 октября в наукограде Кольцово Новосибирской области проходил отраслевой комплекс мероприятий в сфере биотехнологии, биофармацевтики и вирусологии OpenBio-2020. Традиционно OpenBio делится на научную конференцию и деловой форум. В работе конференции приняли участие молодые ученые из 34 регионов России. Было представлено более семидесяти докладов в четырех секциях: «Биотехнология», «Вирусология», «Биофизика» и «Молекулярная биология». В режиме видеоконференцсвязи работали 30 ученых, которые не смогли приехать из-за неблагоприятной эпидемиологической ситуации.



Деловой форум в заключительный день стал кульминацией OpenBio-2020. Основные площадки форума: экспертная сессия «Технологии жизни»; круглый стол «Противодействие мировым вирусным угрозам»; круглый стол «Исследовательская инфраструктура Megascience: синхротрон для наук о жизни»; экспертная дискуссия «Карьера в инновациях: с чего начать»; круглый стол «Фарммедобращение. Новая эпоха фарминдустрии». Всего в событиях OpenBio участвовали 2,7 тыс. человек, из них почти пятьсот – офлайн.

В условиях коронавирусной пандемии, охватившей всю планету, главное внимание на деловом форуме со стороны СМИ и экспертов было приковано к круглому столу «Противодействие мировым вирусным угрозам». Организаторы OpenBio и модератор дискуссии **Сергей Нетесов**, заведующий лабораторией бионанотехнологии НГУ, член-корреспондент РАН, смогли собрать для диалога ведущих специалистов в области изучения, профилактики, диагностики, лечения коронавирусной инфекции. Со своими докладами, помимо признанных экспертов-эпидемиологов, таких как **Михаил Фаворов**, президент американской компании DiaPrep System Inc., смогли выступить российские разработчики лекарств и тест-систем.

Александр Таранин, заведующий лабораторией иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, рассказал о процессе получения и валидации моноклональных антител человека, способных нейтрализовать вирус SARS-CoV2. По сло-

вам **Таранина**, результаты его исследований сравнимы с аналогичными исследованиями американской компании Regeneron Pharmaceuticals, которая также занималась поиском антител, способных снизить вирусную нагрузку и сопутствующие симптомы у больных COVID-19.

«Антитела, которые мы получили, – первые реальные кандидаты в России на роль высокоэффективного терапевтического средства против COVID-19. Следующие шаги – создание клеточного суперпродуцента, масштабирование продукции, доклинические и клинические испытания. Американские компании Eli Lilly and Company и Regeneron Pharmaceuticals затравили 8 месяцев от получения первых моноклональных антител до проведения первых клинических испытаний. Сложно сказать, сколько времени этот процесс займет у нас. Доклиническими и клиническими испытаниями должны заниматься другие организации и компании», – рассказал **Александр Таранин**.

При этом докладчик, отвечая на дополнительный вопрос о возможной стоимости российского аналога «Регенерона», отметил, что цена на препарат может быть гораздо ниже, чем в США, поскольку потребуются меньшая дозировки для достижения того же терапевтического эффекта.

Михаил Лосев, директор новосибирской компании «Медико-биологический союз», представил разработку изотермального ПЦР-теста, который позволяет получать готовый результат за считанные минуты.



«Если мы говорим о работе в зоне аэропорта, то там на один тест можно потратить 10–15 минут. Не исключаю, что и это время может быть сокращено», – пояснил **Лосев**.

По словам **Лосева**, компания «Медико-биологический союз» находится на финишной стадии второго этапа разработки – создания переносного прибора, с помощью которого можно исследовать взятые образцы на любые вирусные инфекции оперативно в полевых условиях.

Александр Спицын, директор научно-производственного объединения «Сиббиовет», рассказал о препарате для лечения COVID-19 на основе высокополимерной дрожжевой РНК, способной проникать в клетку и стимулировать выработку интерферона всех типов, первичного и вторичного иммунного ответа.

«Мы провели исследование на клетках, содержащих коронавирус, согласно которой при использовании нашего препарата всего через 4–5 дней клетка переставала выделять вирус. Это хорошие результаты. Наша работа в ветеринарии с прототипом этого препарата свидетельствует о том, что он максимально безопасен», – рассказал **Спицын**.

По словам разработчика, препарат будет зарегистрирован как медицинский к осени 2021 года. В настоящий момент «Сиббиовет» активно взаимодействует с московскими профильными институтами для проведения доклинических и клинических испытаний. «Перспективы у нас колоссальные, но на все требуется определенное время», – пояснил директор НПО.

В свою очередь **Сергей Нетесов** заметил, что само по себе лечение рекомбинантными интерферонами может иметь побочные эффекты.

«Долговременная индукция интерферона способна вызывать дикую депрессию. Важно понимать, что у разработки «Сиббиовет» не было комплекса исследований на двух типах животных и еще лучше на обезьянах. Ее безопасность не доказана», – пояснил модератор дискуссии в ходе брифинга после круглого стола.



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.
- ✓ Дженирики 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**

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-26-31>
УДК 544.971



Оригинальная статья/Research article

Фазовые равновесия биологически активных систем 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана

Л. М. Юсупова¹, А. Н. Хузиахметова^{2*}, Е. Г. Горелова¹, В. К. Мингазова¹, И. В. Галкина²

1 – ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (КНИТУ), 420015, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68.
2 – ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (К(П)ФУ), 420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлёвская, д. 18

*Контактное лицо: Хузиахметова Алсу Нафисовна. E-mail: alsuwkin@list.ru

ORCID: Л. М. Юсупова – <https://orcid.org/0000-0002-4088-6593>; А. Н. Хузиахметова – <https://orcid.org/0000-0001-6806-3604>; Е. Г. Горелова – <https://orcid.org/0000-0001-8911-8571>;
В. К. Мингазова – <https://orcid.org/0000-0003-0077-8296>; И. В. Галкина – <https://orcid.org/0000-0002-7899-555X>.

Статья поступила: 24.06.2020. Статья принята в печать: 10.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Одним из интенсивных способов увеличения лечебной эффективности и безопасности лекарственного препарата является сочетание нескольких уже известных субстанций или химических соединений, приводящие к появлению эффекта синергии. Данный метод создания лекарственного препарата представляет собой одну из важнейших тенденций последнего времени, поскольку синергетический эффект позволяет достичь большей фармакологической активности, расширить спектр медицинского применения и уменьшить токсическое действие препарата на организм. К таким активным фармацевтическим субстанциям относится бинарная смесь «Димиксан» (смесь 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана (4,6-ДНДХБФО) и 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана (5-НДХБФО)), которая проявляет потенцированный синергизм в отношении ультрарезистентного микроорганизма – плесневого гриба вида *Aspergillus niger*. Однако механизм синергизма смеси 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО совершенно не изучен. Результаты определения термодинамических характеристик и фазовых равновесий в этих системах позволят определить характер взаимодействия между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, что, несомненно, будет способствовать оптимальной организации производства перспективного лекарственного препарата.

Цель. Установления характера взаимодействия между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в бинарной системе.

Материалы и методы. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) изучены фазовые равновесия в системе 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в широком диапазоне концентраций компонентов. По диаграмме состояния определены термодинамические характеристики эвтектики: энтальпия и энтропия плавления смесей 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО при различных соотношениях компонентов.

Результаты и обсуждение. На основе результатов исследования выявлены фазовые реакции с физико-химическим взаимодействием 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в двухкомпонентных системах с образованием эвтектических сплавов типа «твердый раствор». Определены удельные значения энтальпий плавления эвтектических составов, по которым рассчитаны энтропии плавления.

Заключение. Установлен характер взаимодействия между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в системе, приводящий к появлению эффекта синергии. Полученные результаты имеют важное значение для прогнозирования эвтектических составов 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в качестве фармацевтически активных субстанций, обладающих повышенной биологической активностью.

Ключевые слова: 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросан, 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросан, фазовые равновесия, эвтектика, энтальпия и энтропия плавления, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Луиза Магдануровна Юсупова является руководителем научной школы, посвященной изучению синтеза и физико-химических свойств галогензамещенных нитробензофуросанов. Алсу Нафисовна Хузиахметова и Елена Георгиевна Горелова синтезировали образцы 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана, составляли смесевые композиции необходимого состава, а также были обсуждены методология дальнейших исследований. Венера Каямтиновна Мингазова провела исследования аналитических образцов методом дифференцированно-сканирующей калориметрии. Все авторы участвовали в обработке и интерпретации данных. Алсу Нафисовна Хузиахметова и Елена Георгиевна Горелова участвовали в написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета и Казанского национального исследовательского технологического университета в целях повышения их конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Для цитирования: Юсупова Л. М., Хузиахметова А. Н., Горелова Е. Г., Мингазова В. К., Галкина И. В. Фазовые равновесия биологически активных систем 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуросана и 5-нитро-4,6-дихлорбензофуросана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-26-31>

Phase Equilibrium of Biologically Active Systems 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxane and 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxane

Luiza M. Yusupova¹, Alsu N. Khuziakhmetova^{2*}, Elena G. Gorelova¹, Venera K. Mingazova¹,
Irina V. Galkina²

1 – Kazan National Research Technological University, 68, Karl Marx str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russia
2 – Kazan Federal University, 18, Kremlyovskaya str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420008, Russia

*Corresponding author: Alsu N. Khuziakhmetova. E-mail: alsuwkin@list.ru

ORCID: Luiza M. Yusupova – <https://orcid.org/0000-0002-4088-6593>; Alsu N. Khuziakhmetova – <https://orcid.org/0000-0001-6806-3604>;
Elena G. Gorelova – <https://orcid.org/0000-0001-8911-8571>; Venera K. Mingazova – <https://orcid.org/0000-0003-0077-8296>; Irina V. Galkina – <https://orcid.org/0000-0002-7899-555X>.

Received: 24.06.2020. Revised: 10.09.2020. Published: 24.11.2020

© Юсупова Л. М., Хузиахметова А. Н., Горелова Е. Г., Мингазова В. К., Галкина И. В., 2020

© Yusupova L. M., Khuziakhmetova A. N., Gorelova E. G., Mingazova V. K., Galkina I. V., 2020

Abstract

Introduction. One of the intensive ways to increase the therapeutic efficacy and safety of a drug is a combination of several already known substances or chemical compounds, leading to the appearance of a synergistic effect. This method of creating a medicinal product is one of the most important trends in recent times, since the synergistic effect allows one to achieve greater pharmacological activity, expand the range of medical applications and reduce the toxic effect of the drug on the organism. These pharmaceutical active substances include a binary mixture "Dimixan" (mixture 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan (4,6-DNDHBFO) and 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan (5-NDHBFO). They demonstrate potentiated synergism to the ultra-resistant mold fungus of the species *Aspergillus niger*. However, the synergy mechanism of the mixture of 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO is not fully studied. The results of determining the thermodynamic characteristics and phase equilibria in these systems will make it possible to determine the nature of the interaction between 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO, which will undoubtedly contribute to the optimal organization of the production of a promising drug.

Aim. Establishing the nature of the interaction between 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO in the system.

Materials and methods. Using differential scanning calorimetry (DSC), phase equilibria in the 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO systems were studied in a wide range of component concentrations. From the state diagram, the thermodynamic characteristics of the eutectic were determined: the enthalpy and entropy of melting of mixtures of 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO at different ratios of components.

Results and discussion. Based on the results of the study, phase reactions with the physicochemical interaction of 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO in two-component systems with the formation of eutectic alloys of the "solid solution" type are identified. The specific values of the enthalpies of melting of alloys of eutectic compositions were determined, from which the entropies of melting were calculated. The results of a study of the density of eutectic compositions of 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO indicate the formation of an interstitial solid solution.

Conclusion. The nature of the interaction between 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO in the system, leading to the appearance of a synergy effect, has been established. The results obtained are important for predicting the eutectic compositions of 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO as active pharmaceutical ingredient with increased biological activity.

Keywords: 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan, 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan, phase equilibria, eutectic, melting enthalpy, melting entropy, differential scanning calorimetry.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Luiza M. Yusupova is the head of the scientific school dedicated to the study of the synthesis and physicochemical properties of halogenated nitrobenzofuroxans. Alsu N. Khuziakmetova and Elena G. Gorelova synthesized samples of 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan and 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan, made mixture compositions of the required composition, and also discussed the methodology of further research. Venera K. Mingazova carried out research of analytical samples using the method of differential scanning calorimetry. All authors participated in data processing and interpretation. Alsu N. Khuziakmetova and Elena G. Gorelova participated in writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was carried out at the expense of a subsidy allocated within the framework of state support of the Kazan (Volga Region) Federal University and the Kazan National Research Technological University in order to increase their competitiveness among the world's leading research and educational centers.

For citation: Yusupova L. M., Khuziakmetova A. N., Gorelova E. G., Mingazova V. K., Galkina I. V. Phase equilibrium of biologically active systems 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxane and 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxane. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-26-31>

ВВЕДЕНИЕ

В фармацевтической отрасли и в фармацевтической химии ведется постоянный поиск высокоэффективных фармакологических субстанций, обладающих положительной эффективностью в сочетании с низкой токсичностью [1, 2]. Бензофуроксаны, как представители гетероциклических соединений, являются перспективным классом для поиска новых активных фармацевтических субстанций (АФС). В ряду соединений бензофуроксанового ряда большой интерес вызывают такие соединения, как 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, которые перспективны для создания инновационных АФС для ветеринарии и медицины. Путем фармакологического скрининга было установлено, что указанные соединения обладают широким спектром биологического действия: акарицидным, фунгицидным, антибактериальным и др. [3].

Ранее было установлено, что смесь 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО тормозит рост грибов плесневения при заданной суммарной концентрации значительно больше, чем каждый из индивидуальных компонентов [4]. Такое физико-биологическое явление назы-

вается *синергизмом*. Синергизм является чрезвычайно важным эффектом в практическом отношении, так как дает возможность усиления биологической и фармакологической активности при значительно низких концентрациях компонентов, следовательно, важный аспект синергизма – это уменьшение токсического действия [5–7]. Бинарная смесь 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО проявляет синергизм больше аддитивного эффекта, т. е. имеет место потенцированный эффект.

Механизм синергизма смеси 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО совершенно не изучен. Проявляемый синергизм смеси 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО может иметь как физическую природу, так и химическую природу. Нами предложена гипотеза о возникновении химической связи между молекулой 5-НДХБФО и молекулой 4,6-ДНДХБФО с образованием нового соединения. Информацию об образовании нового молекулярного соединения может дать исследование фазовой диаграммы состояния бинарной смеси 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО с различным массовым соотношением компонентов: 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90.

В данной статье представлены результаты изучения диаграммы состояния двухкомпонентной системы на основе 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в широком диапазоне соотношений. Исследование фазовых равновесий в двухкомпонентных системах, содержащих 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, проводятся впервые. На сегодняшний день отсутствуют данные об изучении фазовых равновесий и термодинамических характеристик в двухкомпонентных системах 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО. Результаты определения термодинамических характеристик и фазовых равновесий в этих системах позволят определить характер взаимодействия между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО. Выявленные закономерности предполагается использовать для прогнозирования эвтектических составов 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в качестве активных фармацевтических субстанций, обладающих повышенной биологической активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась двухкомпонентная система «5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО» переменного состава. 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО синтезированы по ранее описанным методикам [8]. Степень чистоты была установлена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (жидкостной хроматограф фирмы Perkin Elmer со спектрофотометрическим детектором, США). По данным ВЭЖХ содержание основного вещества в изученных соединениях было не менее с 99,5 масс.%.

Смеси готовили из индивидуальных компонентов, которые взвешивали на аналитических весах CAS CAUY-220 (CAS Corporation, Южная Корея) специального класса точности по ГОСТ 24104-2001 с точностью взвешивания $\pm 0,0001$ г. Смеси для приведения термического анализа готовили путем мокрого смешивания предварительно рассчитанных количеств индивидуальных компонентов в фарфоровых ступках в присутствии легколетучего растворителя – четыреххлористого углерода марки «ч.д.а.» (массовая доля основного вещества 99,6 %, CAS: 56-23-5, ГОСТ 20288-74, АО «ЭКОС-1», Россия). После испарения растворителя для эксперимента была взята навеска бинарной смеси 0,0035 г с точностью до четвертого знака.

Фазовые равновесия были исследованы с помощью методов термического анализа (ТА) для смесей 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО в диапазоне концентраций от 90:10 до 10:90 (% , вес.). Термический анализ является наилучшим, универсальным и точным методом для установления состояния конденсированных систем и исследования. Термический анализ позволяет установить температурную зависимость сосуществующих фаз от состава [9, 10].

Фазовые переходы в двухкомпонентных системах 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО в диапазоне концентраций

от 90:10 до 10:90 (% , вес.) были изучены с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Измерения проводили в динамической атмосфере воздуха (скорость потока 10 мл/мин) в диапазоне температур 25 до 150 °С со скоростью нагрева/охлаждения 10 °С/мин, согласно ГФ XIV РФ [11], с помощью синхронного микротермоанализатора TGA/DSC 3+ (Mettler Toledo, Швейцария). Точную навеску пробы, измельченной до однородного состояния в количестве 0,0035 г, помещали в алюминиевые тигли 25 мкл, (30085850) (Mettler Toledo, Швейцария) и закрывали крышкой с отверстием с помощью механического микропресса MP 120 (Proxxon Micromot, Германия). Термопара прибора была предварительно откалибрована по температуре, энтальпии и чувствительности с помощью стандартных образцов (СО) [бензойная кислота (ГСО 5504-90, Россия) и металл галлий с чистотой 99,99 % (ГСО 2312-82, Россия)] [12, 13].

При использовании методов ТГА и ДСК были определены следующие параметры для композиций:

- экзотермические и эндотермические процессы с соответствующими температурами начала и конца;
- значения удельных тепловых эффектов фазовых переходов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фазовая диаграмма бинарной системы 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО. Согласно литературным данным, диаграмма плавкости бинарных смесей бывает двух типов: диаграмма с непрерывным рядом твердых растворов и диаграмма состояния системы с ограниченным рядом твердых растворов и эвтектоидной точкой. Для диаграммы первого типа характерно отсутствие разрывов непрерывности в составах твердого раствора, образуется всегда один и тот же твердый раствор переменного состава одного структурного вида. Для второго типа диаграммы в отличие от системы с непрерывным рядом твердых растворов существует не один, а два твердых раствора различного структурного типа [14, 15].

Фазовая диаграмма бинарной системы 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, приведенная на рисунке 1, построена по экстраполированным значениям температуры плавления, полученные в ходе ДСК-анализа (таблица 1).

Температуры плавления анализируемых смесей исследовались как средний результат всех измерений, погрешность которых оценивалась дисперсией средней величины в доверительном интервале 95%-ой вероятности. Диаграмма состояния представляет собой зависимость температуры плавления от состава образца. Построение диаграмм состояния плавкости сводилась к графическому объединению точек, соответствующих температурам фазовых переходов [6].

Таблица 1. Данные экстраполированных температур плавления смесевых композиций 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО в широком диапазоне концентраций, полученные методом ДСК

Table 1. Data on extrapolated melting temperatures mixed compositions of 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO in a wide concentration range obtained by the DSC method

Исследуемые смеси Test mixtures		Температуры фазовых переходов, °С Phase transition temperatures, °C	
Соотношение компонентов, % Component ratio, %		Первый эндотермический эффект First endothermic effect	Второй эндотермический эффект Second endothermic effect
4,6-ДНДХБФО 4,6-DNDHBFO	5-НДХБФО 5-NDHBFO		
100	0	136,4 ± 0,2	–
90	10	83,8 ± 0,1	117,1 ± 0,8
80	20	82,8 ± 0,1	114,2 ± 0,2
70	30	84,2 ± 0,5	105,9 ± 0,6
60	40	82,2 ± 0,3	–
50	50	83,9 ± 0,1	–
40	60	84,2 ± 0,6	–
30	70	84,4 ± 0,4	100,5 ± 0,4
20	80	84,1 ± 0,6	102,9 ± 0,6
10	90	84,3 ± 0,8	104,3 ± 0,1
0	100	116,6 ± 0,1	–

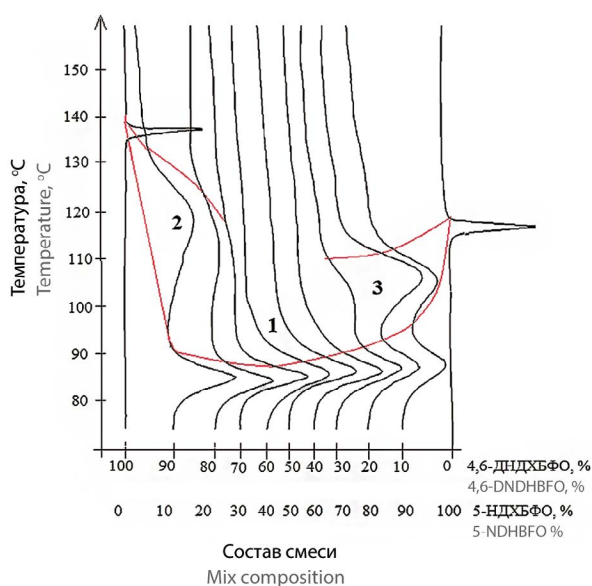


Рисунок 1. Фазовая диаграмма бинарной системы 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО

1 – однофазная область расплавленного твердого раствора; 2 – двухфазная область расплавленного твердого раствора и избыточных кристаллов 4,6-ДНДХБФО; 3 – двухфазная область расплавленного твердого раствора и избыточных кристаллов 5-НДХБФО

Figure 1. Phase diagram of the binary system 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO

1 – single-phase region of molten solid solution; 2 – two-phase region of molten solid solution and excess crystals of 4,6-DNDHBFO; 3 – two-phase region of molten solid solution and excess 5-NDHBFO crystals

Из рисунка видно, что диаграмма состояния бинарной смеси 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО представляет собой систему с ограниченным рядом твердых растворов: один на основе структуры 4,6-ДНДХБФО (2) и другой – на основе структуры 5-НДХБФО (3).

Между концентрациями бинарной смеси 30 % 5-НДХБФО – 70 % 4,6-ДНДХБФО и смеси 60 % 5-НДХБФО – 40 % 4,6-ДНДХБФО твердые растворы между компонентами 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО не образуются (разрыв непрерывности).

Из таблицы 1 видно, что при соотношении 4,6-ДНДХБФО : 5-НДХБФО = 60:40 (% , вес.) смесь имеет самую низкую температуру плавления – 82,21 ± 0,3 °С. Композиция с самой низкой температурой плавления называется *эвтектической смесью*. Когда бинарная смесь имеет область с самой низкой температурой плавления (эвтектоидная точка), то это означает образование молекулярного соединения определенного состава. Диаграммы фазового равновесия систем, в которых компоненты образуют молекулярные соединения, относятся к третьему типу [16].

Определение энтальпии и энтропии плавления эвтектических составов. При рассмотрении процессов, протекающих в твердофазных системах, на термодинамическое равновесие существенное влияние оказывают такие термодинамические функции системы как энтальпия плавления и энтропия.

Энтальпия является важным показателем в системе. Ее изменение при образовании твердых растворов может быть как положительной, так и отрицательной. При деформационном искажении кристаллической решетки вследствие различий в размерах атомов компонентов, участвующих в смешении, наблюдаются положительные значения энтальпии, а в случае связывания частиц смешиваемых компонентов при образовании молекулярных систем и комплексов – отрицательные значения энтальпии. То есть энтальпия характеризуется определенной затратой энергии на деформацию кристаллической структуры при нарушении кристаллической структуры ингредиентов системы [16].

Энтальпии плавления двухкомпонентных систем 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО определяли по данным дифференциальной сканирующей калориметрии.

Энтропия является важным показателем упорядочивания в системе. В случае перехода системы из менее упорядоченного состояния в более упорядоченное энтропия системы уменьшается ($S < 0$) [16, 17].

Энтропия плавления системы 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО была вычислена по формуле [17]:

$$\Delta S = \Delta H / T_{\text{пл}}, \quad (1)$$

где ΔH – энтальпия плавления, Дж/г; $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, К.

В таблице 2 представлены данные по энтальпии и энтропии плавления эвтектических составов 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО.

Таблица 2. Энтальпии (ΔH), энтропии ($\Delta S_{\text{общ}}$) плавления эвтектических составов 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО

Table 2. Enthalpies (ΔH), entropies ($\Delta S_{\text{general}}$) of melting of eutectic compositions 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO

№	Соотношение компонентов, % Component ratio, %		ΔH , Дж/г ΔH , J/g			$\Delta S_{\text{общ}}$ мДж/г · К $\Delta S_{\text{general}}$ mJ/g · K
	5-НДХБФО 5-NDHBFO	4,6-ДНДХБФО 4,6-DNDHBFO	1 пик 1 peak	2 пик 2 peak	$\Delta H_{\text{общ}}$ $\Delta H_{\text{general}}$	
1	0	100	-46,63	–	-46,63	-0,35
2	10	90	-12,68	-22,35	-35,03	-0,34
3	20	80	-17,94	-13,62	-31,56	-0,34
4	30	70	-27,18	-0,1	-27,28	-0,32
5	40	60	-44,75	–	-44,75	-0,54
6	50	50	-43,68	–	-43,68	-0,52
7	60	40	-51,38	–	-51,38	-0,61
8	70	30	-53,46	-6,53	-59,99	-0,67
9	80	20	-11,52	-22,46	-33,98	-0,36
10	90	10	-12,81	-15,78	-28,59	-0,30
11	100	0	-78,28	–	-78,28	-0,67

Как видно из таблицы 2, величины энтальпии плавления индивидуальных 5-НДХБФО, 4,6-ДНДХБФО и их смесей во всем диапазоне концентраций имеют отрицательные величины. Известно, что отрицательная энтальпия смешения ($\Delta H < 0$) в большей степени характерна для твердых растворов [16].

Наибольшие значения отрицательных величин энтальпии и энтропии приходятся к области между концентрациями бинарной смеси 40 % 5-НДХБФО – 60 % 4,6-ДНДХБФО и смеси 70 % 5-НДХБФО – 30 % 4,6-ДНДХБФО, где вероятно, происходит образование молекулярного соединения в наибольшей степени.

Отрицательные значения энтальпии плавления всех изучаемых систем свидетельствует об образовании при плавлении твердых растворов с межмолекулярными контактами между молекулами 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами термического анализа впервые экспериментально исследованы фазовые равновесия в двухкомпонентных системах 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО в диапазоне концентраций от 90:10 до 10:90 (% , вес.) и установлено, что диаграмма состояния бинарной смеси 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО представляет собой систему с ограниченным рядом твердых растворов: один на основе структуры 4,6-ДНДХБФО (2) и другой на основе структуры 5-НДХБФО (3). Примечательным является то, что ранее смесь 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 90:10 (% , вес.) показала максимальную синергетическую активность против ультра-резистентного микроорганизма – грибов плесневения *Aspergillus niger* [4].

В смесях с содержанием 5-НДХБФО (от 30 до 60 %) и 4,6-ДНДХБФО (от 60 до 40 %) твердые растворы между компонентами 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО не образуются (разрыв непрерывности). В этой области диаграммы бинарная смесь имеет область с самой низкой температурой плавления (эвтектоидная точка). Это означает образование молекулярного соединения определенного состава, обладающая минимальным коэффициентом синергизма в отношении *Aspergillus niger* (в отличие от смеси с избыточным содержанием 5-НДХБФО в бинарной смеси) [4].

Настоящее исследование активной фармацевтической субстанции 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО термическими методами доказало, что явление синергизма между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в отношении ультра-резистентных микроорганизмов напрямую связано с их межмолекулярным взаимодействием в бинарной системе. Установление характера межмолекулярного взаимодействия между данными соединениями требует применения и других физико-химических методов фармацевтического анализа, поскольку понимание процессов происходящих между фармацевтически активными соединениями позволит создать не только оптимальный состав перспективной АФС, но и разработать технологию производства лекарственного препарата для ветеринарии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаев С. М. О рациональном подходе к разработке многокомпонентных лекарственных препаратов. Улан-Удэ: БФ СО АН СССР. 1986. 48 с.
2. Кант И. А. Комбинированная химиотерапия. Общие вопросы применения лекарств. 2017;5:35–39.
3. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М., Быков А. Р., Гарипов Т. В., Фаляхов И. Ф. Средства биологической защиты многоцелевого назначения на основе хлорпроизводных нитробензофураксана. Вестник Казанского технологического университета. 2004;1:103–111.
4. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М., Зыкова И. Е., Мухаметшина А. М., Фаляхов И. Ф., Гарипов Т. В. Биологическая активность хлорпроизводных нитробензофураксана. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2005;4:45–48.
5. Хамед А. А. Синергия и антагонизм ветеринарных препаратов. Ветеринария. Животноводство в России. 2013. С. 2–3.
6. Киселева Т. Л., Дронова М. А. Синергетические аспекты современной фитотерапии. Новости медицины и фармации. 2012;7(49):4–8.
7. Кершенгольц Б. М., Чернобровкина Т. В., Шейн А. А., Хлебный Е. С., Аньшаков В. В. Нелинейная динамика (синергетика) в химических, биологических и биотехнологических системах. Якутск: ГОУ ВПО Якутский государственный университет им. М. К. Аммосова. 2009. С. 92–163.
8. Юсупова Л. М., Бузыкин Б. И., Молодых Ж. В., Фаляхов И. Ф., Абдрахманов И. Ш., Хисамутдинов Г. Х., Беляев П. Г., Угрюмова В. С., Равилов А. З., Юсупова Г. Р., Шарнин Г. П., Булидоров В. В., Свиридов С. И., Анисимова Н. Н. Способ получения смеси 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофураксанов и смесь 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофураксанов обладающая бактерицидной, вирулицидной и споридицидной активностью. Патент 2051913 РФ. Заявл. 22.04.1992. Опубл. 10.01.1996.
9. Мощенский Ю. В., Федотов С. В., Жнякина Л. Е., Смелова С. Г., Ткаченко М. Л. Система дифференциальной сканирующей калориметрии для исследования лекарственных объектов. Химико-фармацевтический журнал. 2005;39(11):46–49.

10. Ткаченко М. Л., Жнякина Л. Е., Мощенский Ю. В., Лосева М. А., Леваниук И. А. Термические исследования и некоторые технологические свойства тройной лекарственной системы «кофеин-парацетамол-мочевина». *Фармация*. 2008;2:29–32.
11. Государственная фармакопея РФ. XIV издание. Т. 1. ОФС.1.2.1.0027.18. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2018.
12. Стандартные образцы температур и теплот фазовых переходов (комплект СОТСФ). ГСО 2312-82/2316-82. 2019.
13. Gatta G. D., Richardson M. J., Sarge S. M., Stolen S. Standard, calibration and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning calorimetry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2006;78(7):1455–1476.
14. Петьков В. И., Грудзинская Е. Ю. Изоморфизм. Твердые растворы. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского. 2010. 144 с.
15. Мощенский Ю. В., Ткаченко М. Л. Физико-химический анализ эвтектических систем лекарственных композиций. *Известия Самарского научного центра РАН. Химия и химическая технология*. 2004. С. 87–91.
16. Степановских Е. И., Брусницына Л. А. Расчет изменений энтропии в системах без химического превращения. Екатеринбург: УГТУ-УПИ. 2008. 44 с.
17. Агафонова Е. В., Мощенский Ю. В., Ткаченко М. Л. Определение термодинамических параметров плавления сульфаметоксазола, триметоприма, карбамида, никодина и их двойных эвтектик методом дифференциальной сканирующей калориметрии. *Журнал физической химии*. 2013;87(8):1301–1304.
10. Tkachenko M. L., Zhniakina L. E., Moshchenskii Yu. V., Loseva M. A., Levaniuk I. A. Thermal studies and some technological properties of the «caffeine-paracetamol-urea» triple drug system. *Farmaciya = Pharmacy*. 2008;2:29–32. (In Russ.).
11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV. V. 1. OFS.1.2.1.0027.18. Moscow: Nauchnyj centr ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. 2018. (In Russ.).
12. Standard samples of temperatures and heats of phase transitions (SOTSF set). SSS 2312-82/2316-82. 2019. (In Russ.).
13. Gatta G. D., Richardson M. J., Sarge S. M., Stolen S. Standard, calibration and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning calorimetry (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2006;78(7):1455–1476.
14. Petkov V. I., Grudinskaya E. Yu. Isomorphism. Solid solutions. Nizhny Novgorod: Nizhegorodskij gosudarstvennyj universitet im. N. I. Lobachevskogo = National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod. 2010. 144 p. (In Russ.).
15. Moshchenskii Yu. V., Tkachenko M. L. Physicochemical analysis of eutectic systems of medicinal compositions. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN. Himiya i himicheskaya tekhnologiya*. 2004. P. 87–91. (In Russ.).
16. Stepanovskikh E. I., Brusnitsyna L. A. Calculation of changes in entropy in systems without chemical transformation. Yekaterinburg: UGTU-UPI. 2008. 44 p. (In Russ.).
17. Agafonova E. V., Moshchensky Yu. V., Tkachenko M. L. Determination of the thermodynamic parameters of the melting of sulfamethoxazole, trimethoprim, urea, nicodine and their double eutectics using differential scanning calorimetry. *Zhurnal fizicheskoy himii*. 2013;87(8):1301–1304. (In Russ.).

REFERENCES

1. Nikolaev S. M. On a rational approach to the development of multicomponent drugs. Ulan-Ude: *BF SO AN SSSR*. 1986. 48 p. (In Russ.).
2. Kant I. A. Combined chemotherapy. *Obshchie voprosy primeneniya lekarstv = General questions about the use of drugs*. 2017;5:35–39. (In Russ.).
3. Yusupova L. M., Garmonov S. Yu., Zakharov I. M., Bykov A. R., Garipov T. V., Falyakhov I. F. Multipurpose biological protection agents based on chlorine derivatives of nitrobenzofuroxan. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2004;1:103–111. (In Russ.).
4. Yusupova L. M., Garmonov S. Yu., Zakharov I. M., Zykova I. E., Mukhametshina A. M., Falyakhov I. F., Garipov T. V. Biological activity of chlorine derivatives of nitrobenzofuroxan. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2005;4:45–48. (In Russ.).
5. Khamed A. A. Synergy and antagonism of veterinary drugs. *Veterinary. Zhivotnovodstvo v Rossii = Animal husbandry of Russia*. 2013. P. 2–3. (In Russ.).
6. Kiseleva T. L., Dronova M. A. Synergistic aspects of modern phytopharmacotherapy. *Novosti mediciny i farmacii*. 2012;7(49):4–8. (In Russ.).
7. Kershengolts B. M., Chernobrovkina T. V., Shein A. A., Khlebnii E. S., Anshakov V. V. Nonlinear dynamics (synergy) in chemical, biological and biotechnological systems. *Yakutsk: GOU VPO Yakutskij gosudarstvennyj universitet im. M. K. Ammosova*. 2009. P. 92–163. (In Russ.).
8. Yusupova L. M., Buzykin B. I., Molody Zh. V., Falyakhov I. F., Abdrakhmanov I. Sh., Khisamutdinov G. Kh., Belyaev P. G., Ugryumova V. S., Ravilov A. Z., Yusupova G. R., Sharnin G. P., Bulidorov V. V., Sviridov S. I., Anisimova N. N. Method of obtaining a mixture of 4-nitro- and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxanes and a mixture of 4-nitro- and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxans having bactericidal, virucidal and sporocidal activity. Patent 2051913 of the Russian Federation. Declared 22. 04.1992. Publ. 10.01.1996. (In Russ.).
9. Moshchenskii Yu. V., Fedotov S. V., Zhniakina L. E., Smelova S. G., Tkachenko M. L. Differential scanning calorimetry system for research of medicinal objects. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2005;39(11):46–49. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-32-39>
УДК 543.5



Оригинальная статья/Research article

Изучение биологически активных твердофазных систем на основе галогензамещенных нитробензофуранов методом ИК-спектроскопии

А. Н. Хузиахметова^{1*}, Е. Г. Горелова², Л. М. Юсупова², А. А. Курмаева²

1 – ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (К(П)ФУ), 420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18

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

*Контактное лицо: Хузиахметова Алсу Нафисовна. E-mail: alsuwin@list.ru

ORCID: А. Н. Хузиахметова – <https://orcid.org/0000-0001-6806-3604>; Е. Г. Горелова – <https://orcid.org/0000-0001-8911-8571>; Л. М. Юсупова – <https://orcid.org/0000-0002-4088-6593>; А. А. Курмаева – <https://orcid.org/0000-0003-1791-4813>.

Статья поступила: 10.08.2020. Статья принята в печать: 02.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Биологически активные соединения 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуран (4,6-ДНДХБФО) и 5-нитро-4,6-дихлорбензофуран (5-НДХБФО) эффективно подавляют ультра-резистентные микроорганизмы: стафилококк золотистый *Staphylococcus aureus*, патогенные виды грибов – *Aspergillus niger*, *Coniophora cerebella*, *Candida albicans* и др. Смесевые системы на основе 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО проявляют высокую потенцированную синергетическую активность в отношении *Aspergillus niger*. На сегодняшний день отсутствуют полноценные исследования по изучению механизма синергизма 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО в твердофазной системе. Результаты исследования ИК-спектров твердофазных систем 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО позволят установить характер взаимодействия между компонентами в бинарной смеси, приводящий к возникновению данного эффекта.

Цель. Экспериментальное изучение межмолекулярного взаимодействия 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО методом ИК-спектроскопии.

Материалы и методы. Методом ИК-спектроскопии исследовано межмолекулярное взаимодействие 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО при их различном соотношении в твердофазной системе.

Результаты и обсуждение. На основе результатов исследования выявлено физико-химическое взаимодействие 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО в твердофазных системах. Выявлены сдвиги и изменения интенсивностей характеристических частот функциональных групп, участвующих в образовании межмолекулярных связей между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО.

Заключение. Установлен характер взаимодействия между 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО в твердофазной системе, приводящий к появлению эффекта синергии. Взаимодействие 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО в бинарной системе обусловлено образованием межмолекулярной водородной связи. Во взаимодействии принимают участие протон молекулы 5-НДХБФО, кислород фуранового кольца 4,6-ДНДХБФО, а также атом галогена 4,6-ДНДХБФО при эквимолярном соотношении компонентов твердофазной системы.

Ключевые слова: 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуран, 5-нитро-4,6-дихлорбензофуран, ИК-спектроскопия, межмолекулярная водородная связь, бинарные твердофазные системы, синергетический эффект.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Луиза Магдануровна Юсупова является руководителем научной школы, посвященной изучению синтеза и физикохимических свойств галогензамещенных нитробензофуранов. Алсу Нафисовна Хузиахметова и Курмаева Алина Альбертовна синтезировали образцы 5-нитро-4,6-дихлорбензофурана и 4,6-динитро-5,7-дихлорбензофурана, составляли смесевые композиции необходимого состава. Алсу Нафисовна Хузиахметова и Еленой Георгиевной Гореловой обсуждены методология дальнейших исследований и проведены исследования образцов методом ИК-спектроскопии. Все авторы участвовали в обработке и интерпретации данных. Алсу Нафисовна Хузиахметова и Елена Георгиевна Горелова участвовали в написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета и Казанского национального исследовательского технологического университета в целях повышения их конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Для цитирования: Хузиахметова А. Н., Горелова Е. Г., Юсупова Л. М., Курмаева А. А. Изучение биологически активных твердофазных систем на основе галогензамещенных нитробензофуранов методом ИК-спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-32-39>

Study of Biologically Active Solid-phase Systems Based on Halogen-substituted Nitrobenzofuroxans by the IR Spectroscopy Method

Alsu N. Khuziakhmetova^{1*}, Elena G. Gorelova², Luiza M. Yusupova², Alina A. Kurmaeva²

1 – Kazan Federal University, 18, Kremlyovskaya str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420008, Russia

2 – Kazan National Research Technological University, 68, Karl Marx str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420015, Russia

*Corresponding author: Alsu N. Khuziakhmetova. E-mail: alsuwin@list.ru

ORCID: Alsu N. Khuziakhmetova – <https://orcid.org/0000-0001-6806-3604>; Elena G. Gorelova – <https://orcid.org/0000-0001-8911-8571>; Luiza M. Yusupova – <https://orcid.org/0000-0002-4088-6593>; Alina A. Kurmaeva – <https://orcid.org/0000-0003-1791-4813>.

Received: 10.08.2020. Revised: 02.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Biologically active compounds 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan (4,6-DNDHBF) and 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan (5-NDHBF) effectively inhibit ultra-resistant microorganisms: *Staphylococcus aureus*, pathogenic fungi – *Aspergillus niger*, *Coniophora cerebella*, *Candida albicans* and other microorganisms. Mixed systems based on 4,6-DNDHBF and 5-NDHBF exhibit high potentiated synergistic activity

© Хузиахметова А. Н., Горелова Е. Г., Юсупова Л. М., Курмаева А. А., 2020

© Khuziakhmetova A. N., Gorelova E. G., Yusupova L. M., Kurmaeva A. A., 2020

against *Aspergillus niger*. Currently, there are no full-fledged studies about the mechanism of synergism of 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO in a solid-phase system. The results of the study of solid-phase systems 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO by IR spectroscopy will make it possible to establish the nature of the interaction between the components of the binary mixture.

Aim. Experimental study of the intermolecular interaction of 5-NDHBFO with 4,6-DNDHBFO by the IR spectroscopy method.

Materials and methods. The intermolecular interaction of 5-NDHBFO with 4,6-DNDHBFO at different ratios in a solid-phase system was studied by the IR spectroscopy method.

Results and discussion. Based on the results of the study, the physico-chemical interaction of 5-NDHBFO with 4,6-DNDHBFO in solid-phase systems was revealed. Shifts and changes in the intensities of the characteristic frequencies of functional groups involved in the formation of intermolecular bonds between 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO were revealed.

Conclusion. The nature of the interaction between 4,6-DNDHBFO and 5-NDHBFO in the solid-phase system was established, leading to the appearance of a synergy effect. The interaction of 5-NDHBFO with 4,6-DNDHBFO in a binary system is due to the formation of an intermolecular hydrogen bond. The interaction involves the proton of the 5-NDHBFO molecule, the oxygen of the furan ring of 4,6-DNDHBFO, as well as the halogen atom of 4,6-DNDHBFO at an equimolar ratio of the components of the solid-phase system.

Keywords: 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan, 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan, IR spectroscopy method, intermolecular hydrogen bond, binary solid-phase systems, synergistic effect.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Luiza M. Yusupova is the head of the scientific school dedicated to the study of the synthesis and physicochemical properties of halogenated nitrobenzofuroxans. Alsu N. Khuziakhmetova and Alina A. Kurmaeva synthesized samples of 5-nitro-4,6-dichlorobenzofuroxan and 4,6-dinitro-5,7-dichlorobenzofuroxan, made mixture compositions of the required composition. Alsu N. Khuziakhmetova and Elena G. Gorelova discussed the methodology of further research and carried out research of samples by IR-spectrometry. All authors participated in data processing and interpretation. Alsu N. Khuziakhmetova and Elena G. Gorelova participated in writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was carried out at the expense of a subsidy allocated within the framework of state support of the Kazan (Volga Region) Federal University and the Kazan National Research Technological University in order to increase their competitiveness among the world's leading research and educational centers.

For citation: Khuziakhmetova A. N., Gorelova E. G., Yusupova L. M., Kurmaeva A. A. Study of biologically active solid-phase systems based on halogen-substituted nitrobenzofuroxans by the IR spectroscopy method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-32-39>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время важным фармакологическим аспектом для создания лекарственных препаратов является их высокая биологическая активность, низкая токсичность и минимизация побочных действий на организм. В связи с этим широкое распространение в фармацевтической химии нашло создание эффективных лечебных средств посредством комбинаций нескольких уже известных биологически активных соединений [1–5]. Данное явление основано на эффекте синергии ингредиентов в поликомпонентных лекарственных препаратах.

Синергетические эффекты в многокомпонентных лекарственных средствах могут быть связаны с определенным взаимодействием ингредиентов [6]. Исследование внутри- и межмолекулярных взаимодействий компонентов в таких препаратах является актуальным, поскольку такие взаимодействия определяют структурные и физико-химические свойства систем, их терапевтический эффект в живом организме.

Межмолекулярные взаимодействия, подобно химическим, характеризуются электромагнитной природой. Молекулы различных соединений могут связываться с помощью следующих типов взаимодействий: ван-дер-ваальсовы взаимодействия (дисперсионные, индукционные и ориентационные), специфические водородные связывания и псевдохимические взаимодействия (комплексообразование) [7].

В настоящее время основными методами исследования межмолекулярных взаимодействий являются термические методы, рентгенографические методы и спектрометрические методы анализа. Наиболее распространенным и доступным методом для изучения межмолекулярных взаимодействий является колебательная спектроскопия, в частности ИК-спектроскопия. Метод позволяет получить полную информацию о структурных особенностях молекул. Полосы поглощений ИК-спектров очень чувствительны даже к незначительным изменениям в структурах анализируемых проб. Кроме того, окружающая молекулу среда оказывает прямое действие на движение молекулы ближайшего окружения, что вызывает акцессорный сдвиг частот за счет межмолекулярных сил динамического характера [8].

4,6-динитро-5,7-дихлорбензофуроксан (4,6-ДНДХБФО), 5-нитро-4,6-дихлорбензофуроксан (5-НДХБФО) являются биологически активными соединениями, входящими в состав ветеринарных препаратов «Нитроксан» и «Димиксан». Данные субстанции эффективны при лечении грибковых заболеваний кожи животных, в частности демодекоза, вызванного чесоточными клещами вида *Psoroptes cuniculi* [9, 10]. Препараты прошли доклинические испытания, в результате которых была установлена безопасность их применения [4 класс опасности ($LD_{50} = 3500$ мг/кг)] [11].

Известно [12], что индивидуальные 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО эффективно подавляют ультрарезистентные микроорганизмы: стафилококк золотистый *Staphylococcus aureus*, патогенные виды грибов – *Aspergillus niger*, *Coniophora cerebella*, *Candida albicans* и др. Интересным является то, что относительно *Aspergillus niger* экспериментальные значения фунгицидной активности индивидуальных 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО превосходят известные эталоны как минимум на два порядка, а их бинарные смеси – на три порядка (таблица 1).

На сегодняшний день отсутствуют полноценные исследования, посвященные изучению механизма синергизма смеси 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО. Вследствие того, что молекула 5-НДХБФО представляет собой димер (рисунок 1) с межмолекулярной водородной связью между атомом водорода одной молекулы и N-оксидным кислородом другой молекулы 5-НДХБФО [13], и мы предполагаем, что межмолекулярное взаимодействие 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО происходит в результате аналогичного H-связывания (рисунок 2).

В связи с тем, что физико-химическое взаимодействие молекул способно провоцировать изменения в структуре бинарной системы, это должно отразиться и на внутримолекулярных колебаниях

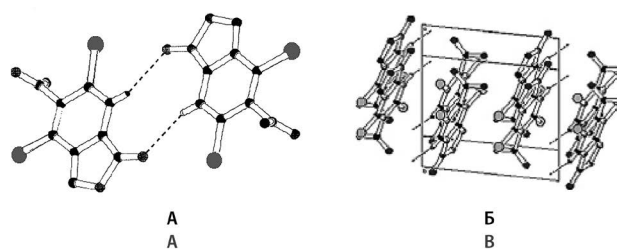


Рисунок 1. Образование димеров молекулы 5-НДХБФО в кристалле за счет C—H...O типа взаимодействия (А) и упаковка молекулы 5-НДХБФО в кристалле (Б)

Figure 1. Formation of dimers of the molecule 5-NDHBFO in the crystal due to the C—H ... O type interactions (A) and molecular packing 5-NDHBFO in crystal (B)

связей, непосредственно участвующих во взаимодействии.

В данной статье представлены результаты исследования системы 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО методом ИК-спектроскопии. Исследования ИК-спектроскопии бинарной системы, содержащих 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, проводятся впервые. Сведения, полученные в результате проведенного исследования, позволят определить характер взаимодействия между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО.

Таблица 1. Сравнительные данные по фунгицидной активности комбинированных смесей 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО [12]

Table 1. Comparative data on the fungicidal activity of the combined mixtures 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO [12]

Тест-объект Test object	Соотношение компонентов в смеси, % Mixing ratio, %		Концентрация состава (J_{50} , %), вызывающая 50 % ингибирование роста мицелия грибов Composition concentration (J_{50} , %) causing 50 % inhibition of fungal mycelium growth		Коэффициент синергизма Synergy coefficient
	5-НДХБФО 5-NDHBFO	4,6-ДНДХБФО 4,6-DNDHBFO	Индивидуальные компоненты Individual components	Смеси Mixes	
1	2	3	4	5	6
<i>Aspergillus niger</i>	100	0	0,0013	–	–
	90	10		0,0002	19,54
	80	20		0,0005	6,3
	70	30		0,0007	3,86
	60	40		0,0007	3,75
	50	50		0,00064	3,21
	40	60		0,0056	1,42
	30	70		0,0012	1,156
	20	80		0,0013	0,93
	10	90		0,0015	0,90
	0	100	0,05	–	–
<i>Coniophora cerebella</i>	100	0	0,0126	–	–
	90	10		0,0017	0,65
	80	20		0,0014	0,88
	70	30		0,0013	1,07
	60	40		0,00056	2,85
	50	50		0,0006	3,08
	40	60		0,00064	3,41
	30	70		0,00058	4,83
	20	80		0,00058	6,55
	10	90		0,00062	9,35
	0	100	0,001	–	–

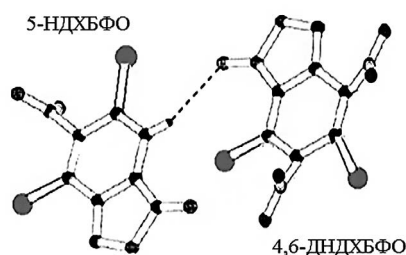


Рисунок 2. Предполагаемая схема взаимодействия 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО

Figure 2. Proposed interaction scheme 5-NDHBFO and 4,6-DNDHBFO

Целью данной работы является экспериментальное изучение межмолекулярного взаимодействия 5-НДХБФО с 4,6-ДНДХБФО методом ИК-спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования рассматривали двухкомпонентную систему «5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО» переменного состава. Индивидуальные соединения 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО были синтезированы по известным методикам [14]. Степень чистоты установлена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, по данным которого содержание основного вещества в соединениях составило не менее 99,5 (% , вес.)

Системы готовили из индивидуальных компонентов 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО, которые взвешивали на аналитических весах высокого класса точности

по ГОСТ 24104-2001 (точность взвешивания $\pm 0,0001$ г). Смеси для ИК-спектроскопии готовили путем мокрого смешивания, предварительно рассчитанных количеств индивидуальных компонентов в фарфоровых ступках в среде четыреххлористого углерода («ч.д.а.» ГОСТ 20288-74). Масса смесей после испарения растворителя составила 0,5000 г. Исследования ИК-спектров были проведены для смесей 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 90:10, 50:50 и 10:90 (% , вес.) соответственно. ИК-спектры аналитических образцов в области $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Bruker Vector-22 (Германия) при комнатной температуре в виде суспензии в вазелиновом масле (CAS 8012-95-1, Panreac). Интерпретацию полученных ИК-спектров проводили с применением данных [15, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что характеристическими полосами 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО являются полосы поглощения в области $1600\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ (фуросановый цикл), 1300 см^{-1} ($\text{N} \rightarrow \text{O}$), $1500\text{--}1570\text{ см}^{-1}$ и $1300\text{--}1370\text{ см}^{-1}$ ($\text{C}_{\text{ар}}\text{--NO}_2$), $600\text{--}800\text{ см}^{-1}$ ($\text{C}_{\text{ар}}\text{--Cl}$) и 3100 см^{-1} ($\text{C}_{\text{ар}}\text{--H}$) – для 5-НДХБФО [15].

На рисунке 3–5 представлен совмещенные ИК-спектры 4,6-ДНДХБФО, 5-НДХБФО и модельных систем 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 90:10, 50:50 и 10:90 (% , вес.).

Из данных, представленных на рисунках 3–5, видно, что по форме все ИК-спектры схожи между собой. Схожесть полученных спектров смесей 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО со спектрами индивидуальных компонентов свидетельствует о том, что композиции

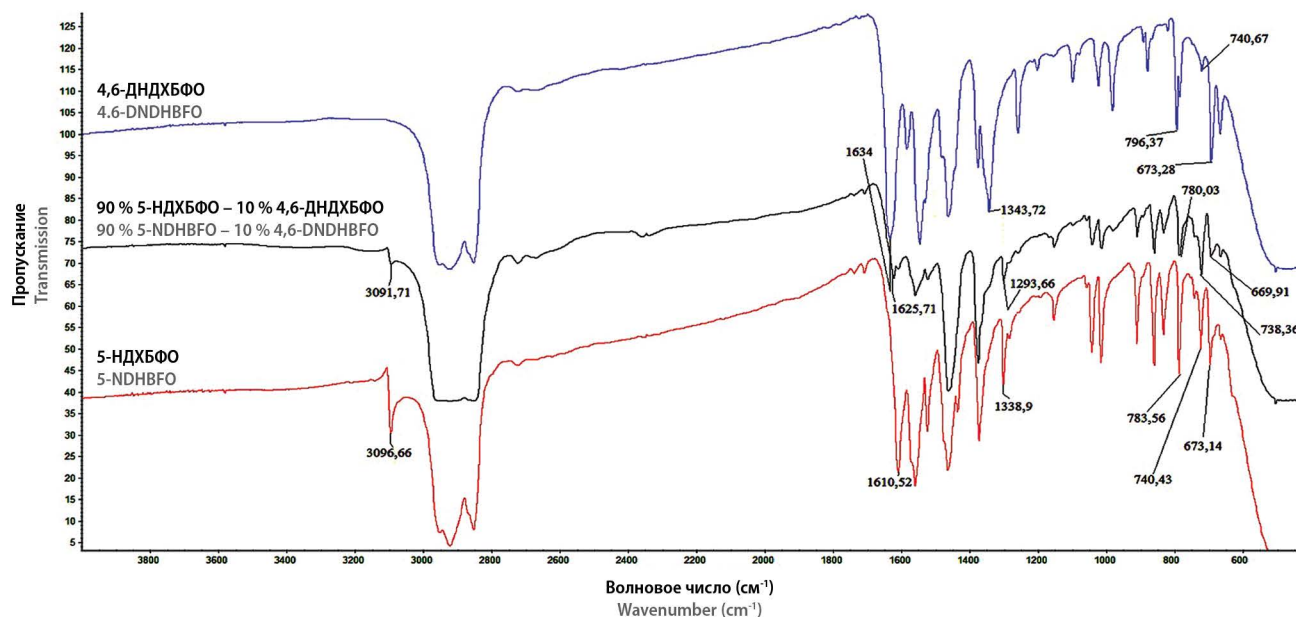


Рисунок 3. ИК-спектр 5-НДХБФО, 4,6-ДНДХБФО и их композиции состава 90:10 (% , вес.)

Figure 3. IR spectrum of 5-NDHBFO, 4,6-DNDHBFO and their composition 90:10 (% , wt)

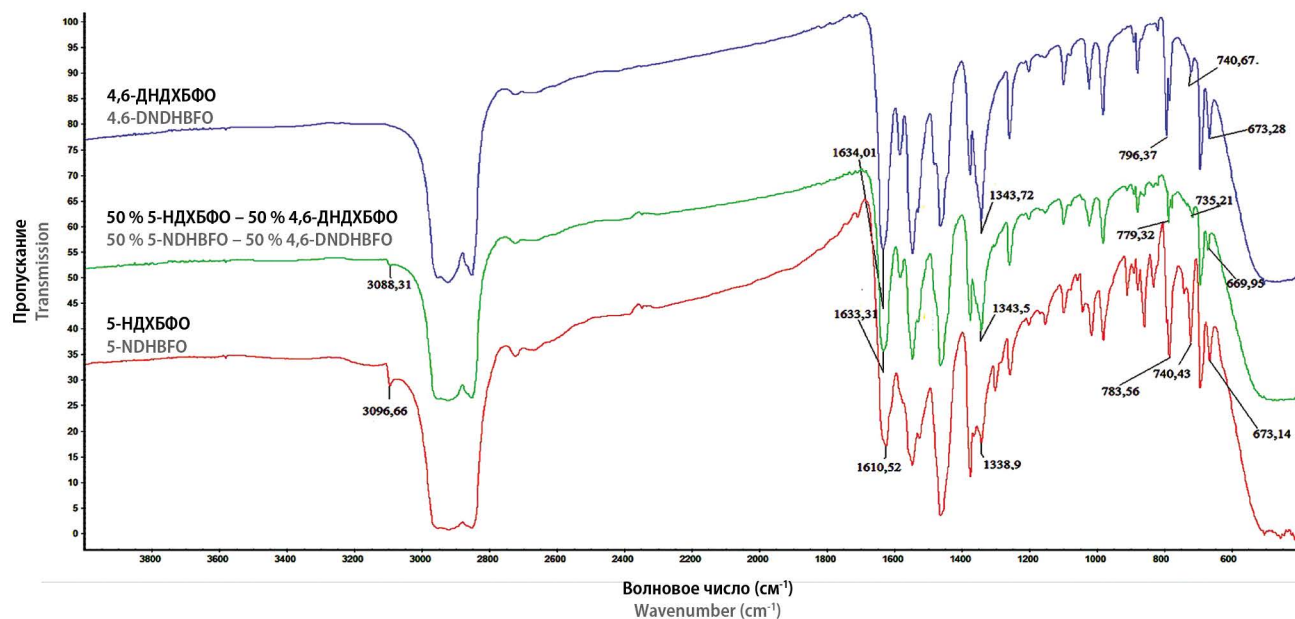


Рисунок 4. ИК-спектр 5-НДХБФО, 4,6-ДНДХБФО и их смеси состава 50:50 (% , вес.)

Figure 4. IR spectrum of 5-NDHBFO, 4,6-DNDHBFO and their composition 50:50 (% , wt.)

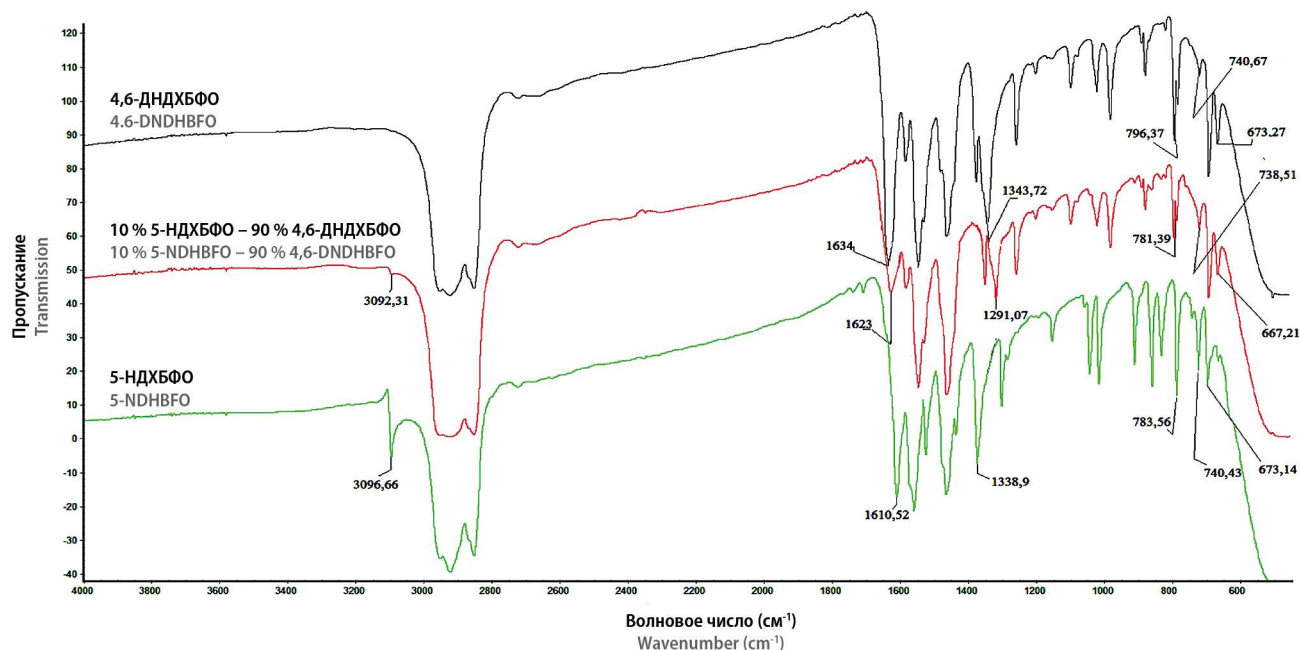


Рисунок 5. ИК-спектр 5-НДХБФО, 4,6-ДНДХБФО и их композиции состава 10:90 (% , вес.)

Figure 5. IR spectrum of 5-NDHBFO, 4,6-DNDHBFO and their composition 10:90 (% , wt.)

5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО не являются новыми структурами с химическим типом взаимодействия.

Экспериментально полученные частоты ИК-спектров 5-НДХБФО, 4,6-ДНДХБФО и композиций на их основе структурированы в таблице 2.

Из данных, представленных на рисунках 3–5 и в таблице 2, видно, что ИК-спектры анализируемых смесевых композиций содержат характеристические

группы: валентные колебания групп $\text{—C}_{\text{ap}}\text{—H}$, —C=N , $\text{N} \rightarrow \text{O}$, $\text{—C}_{\text{ap}}\text{—Cl}$ и $\text{—C}_{\text{ap}}\text{—NO}_2$.

ИК-спектр системы 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 90:10 (% , вес.), представленный на рисунке 3, демонстрирует изменения в области колебаний характеристических групп $\text{—C}_{\text{ap}}\text{—H}$, —C=N , $\text{N} \rightarrow \text{O}$ по сравнению со спектрами индивидуальных компонентов. Основные изменения, наблюдаемые в спект-

Таблица 2. Данные характеристических полос поглощения 4,6-ДНДХБФО, 5-НДХБФО и их бинарных смесей (снятые в вазелиновом масле)**Table 2.** Data of the characteristic absorption bands of 4,6-DNDHBFO, 5-NDHBFO and their binary mixtures (taken in vaseline oil)

Соединения Molecular entity	Колебания связей, частота, ν , cm^{-1} Fluctuation, wave frequency, ν , cm^{-1}					
	$-\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$	$-\text{C}=\text{N}$	$\text{N} \rightarrow \text{O}$	$-\text{C}-\text{Cl}$		
4,6-ДНДХБФО 4,6-DNDHBFO	–	1634	1343,72	796,37	740,67	673,28
5-НДХБФО 5-NDHBFO	3096,66	1610,52	1338,9	783,56	740,43	673,14
5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО (90:10 %) 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO (90:10 %)	3091,71	1625,7	1293,66	780,03	738,36	669,91
5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО (10:90 %) 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO (10:90 %)	3092,31	1623,60	1291,07	781,39	738,51	667,21
5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО (50:50 %) 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO (50:50 %)	3088,31	1633,31	1343,5	779,32	735,21	669,95

рах системы 5-НДХБФО – ДНДХБФО состава 90:10 (% вес.), связаны с уменьшением интенсивности и смещением пиков по сравнению с ИК-спектром индивидуальных ингредиентов системы. В спектре анализируемой композиции наблюдается низкочастотное смещение и уширение пика, характеризующее колебание связи $-\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$ на $4,59 \text{ cm}^{-1}$, высокочастотное смещение пика, характеризующее колебания связи $\text{O}=\text{N}=\text{C}$ на 15 cm^{-1} и смещение полосы колебания группы $\text{N} \rightarrow \text{O}$ на 45 cm^{-1} . Такое явление может быть связано с тем, что N-оксидный кислород молекулы 4,6-ДНДХБФО предоставляет свою неподеленную электронную пару N-акцептору молекулы 5-НДХБФО, в связи с чем 5-НДХБФО взаимодействует с 4,6-ДНДХБФО по типу межмолекулярной водородной связи.

В ИК-спектре композиции 10 % 5-НДХБФО – 90 % 4,6-ДНДХБФО (рисунок 4) наблюдается аналогичная картина: изменение интенсивностей и низкочастотное смещение пиков, характеризующих колебания связей $-\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$, $\text{O}=\text{N}=\text{C}$ и $\text{N} \rightarrow \text{O}$.

ИК-спектр смеси 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 50:50 (% вес.) (рисунок 5) не показал значительных изменений в области колебания связи фуросанового кольца относительно ИК-спектра компонентов сис-

темы. Однако наблюдаются изменения в областях колебания пиков $-\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$ и $-\text{C}_{\text{ap}}-\text{Cl}$. Следовательно можно предположить, что в системе 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава 50:50 %, возможно, возникает межмолекулярная связь между атомом хлора молекулы 4,6-ДНДХБФО и атомом водорода 5-НДХБФО.

О взаимодействии между 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО и образовании межмолекулярных водородсвязанных систем свидетельствует зависимость изменения интенсивностей пиков от состава анализируемых композиций (таблица 3, рисунок 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность спектральных данных позволяет предположить, что в исследуемых системах с содержанием 4,6-ДНДХБФО ниже эквимольного первоначально происходит образование молекулярного комплекса 4,6-ДНДХБФО с димером 5-НДХБФО, что сопровождается разрывом одной водородной связи между группой $\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$ бензольного кольца одной молекулы 5-НДХБФО и $\text{N} \rightarrow \text{O}$ фуросанового цикла другой молекулы 5-НДХБФО. Происходит превращение циклического димера 5-НДХБФО в линейный с по-

Таблица 3. Интенсивность пиков в ИК- спектрах 4,6-ДНДХБФО, 5-НДХБФО и бинарных смесей на их основе**Table 3.** Intensity of peaks in the IR spectra of 4,6-DNDHBFO, 5-NDHBFO and binary mixtures based on them

Область спектра, cm^{-1} Spectrum region, cm^{-1}	Связь Communication	4,6-ДНДХБФО 4,6-DNDHBFO	5-НДХБФО 5-NDHBFO	Смесь 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава (% вес.) A mixture of 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO composition (wt. %)		
				90:10	50:50	10:90
3088–3096	$-\text{C}_{\text{ap}}-\text{H}$	–	20	7	2	5
1610–1635	$-\text{C}=\text{N}$	55	54	25	49	33
1291–1343	$\text{N} \rightarrow \text{O}$	25	19	8	18	10
773–793	$-\text{C}-\text{Cl}$	25	30	20	10	20
735–740		9	16	12	3	14
667–673		25	22	15	4	13

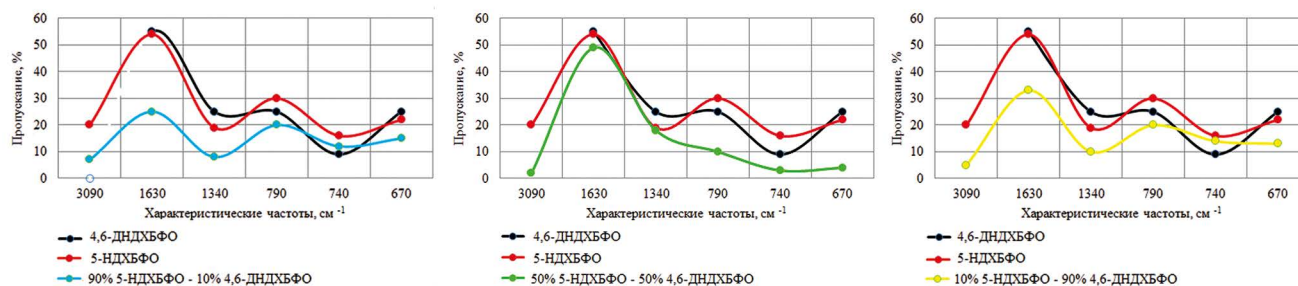


Рисунок 6. Сравнение интенсивностей частот характеристических полос изучаемых систем

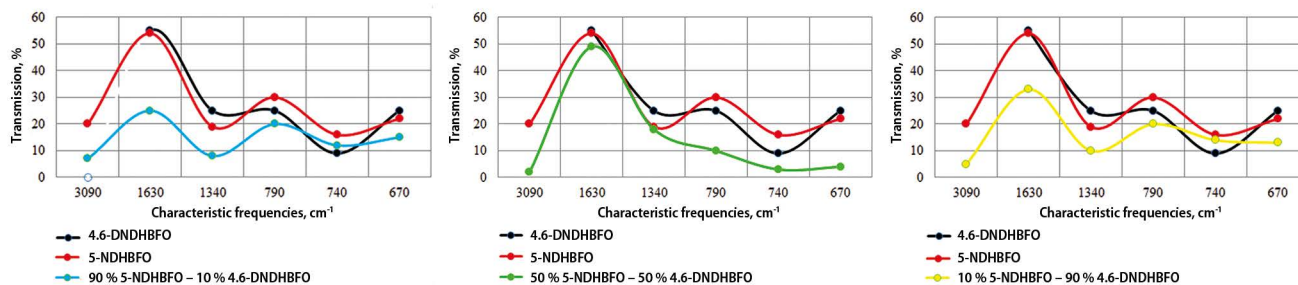


Figure 6. Comparison of the frequency intensities of the characteristic bands of the studied systems

следующим присоединением молекулы 4,6-ДНДХБФО. Увеличение содержания 4,6-ДНДХБФО в системе до эквимолярного сопровождается уменьшением интенсивностей и низкочастотным смещением пиков, характеризующие колебания связей $C_{ar}-H$ и $C_{ar}-Cl$. Это указывает на присутствие в системе комплексов с межмолекулярной водородной связью, которая возникает между группами $C_{ar}-H$ молекулы 5-НДХБФО и $C_{ar}-Cl$ молекулы 4,6-ДНДХБФО. Доля данных «комплексов» будет снижаться в образцах с содержанием 4,6-ДНДХБФО и 5-НДХБФО выше эквимолярного.

Таким образом, по результатам настоящего исследования можно предположить следующие структуры межмолекулярного взаимодействия 5-НДХБФО и 4,6-ДНДХБФО (рисунок 7).

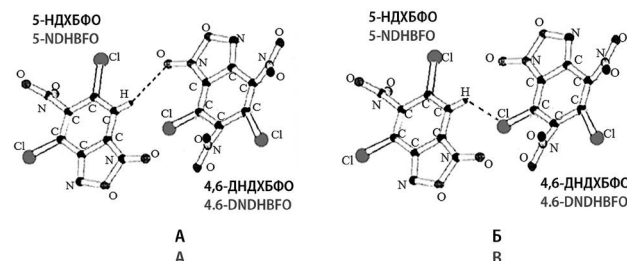


Рисунок 7. Предполагаемая структура системы 5-НДХБФО – 4,6-ДНДХБФО состава

А – 90:10 и 10:90 (% , вес.); Б – 50:50 (% , вес.) с межмолекулярной водородной связью

Figure 7. The proposed structure of the 5-NDHBFO – 4,6-DNDHBFO system composition

А – 90:10 and 10:90 (% , wt.); Б – 50:50 (% , wt) with intermolecular hydrogen bond

ЛИТЕРАТУРА

1. Зефилов О. Н., Зефилов Н. С. Медицинская химия (Medicinal Chemistry). Методологические основы создания лекарственных препаратов. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 2000;41(2):103–108.
2. Алексеева А. А., Торшхоева Р. М., Вишнева Е. А., Левина Ю. Г., Волков К. С. Применение комбинированных препаратов в комплексной терапии кашля у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2011;8(5):98–100.
3. Новиков В. Е., Илюхин С. А. Влияние гипоксена на эффективность кислоты ацетилсалициловой при остром воспалении. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013;76(4):32–35.
4. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Новикова А. В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2013;12(3):56–66.
5. Bryndal I., Ledoux-Rak I., Lis T. Search for molecular crystals with NLO properties: 5-Sulfosalicylic acid with nicotinamide and isonicotinamide. *J. Mol. Struct.* 2014;1068(1):77–83.
6. Вагнер Х., Ульрих-Мерцених Г. Исследование синергии: создание нового поколения фитопрепаратов. *РМЖ «Медицинское обозрение»*. 2016;3:183–189.
7. Магеррамов А. М., Махмудов К. Т., Копылов М. Н., Помбейро А. Дж. Л. Нековалентные взаимодействия в дизайне и синтезе новых соединений. М.: Техносфера, 2016. 624 с.
8. Фадеев Ю. А., Салтанова Е. В. Изучение межмолекулярного взаимодействия полярных молекул в твердых растворах с неупорядоченной микроструктурой. *Ползуновский вестник*. 2006;2: 49–52.
9. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М., Зыкова И. Е., Фалыхов И. Ф., Гарипов Т. В. Мухаметшина А. М. Биологическая активность хлорпроизводных нитробензофуросана. *Вопросы биологии, медицины, фармацевтической науки*. 2005;4: 45–48.
10. Бузыкин Б. И., Гарипов Т. В., Гарипова К. Г., Давлетшин А. Н., Королев Б. А., Молодых Ж. В., Фалыхов И. Ф., Юсупова Л. М. Акарицидный состав для лечения чесотки домашних животных. Патент РФ № 20678963. Заявл. 25.05.1994. Оpubл. 20.10.1996.

11. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М. и др. Фунгицидные и токсикологические свойства функционально замещенных нитробензофуоксанов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2008;42(4):27–28.
12. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М., Быков А. Р., Гарипов Т. В., Фалыхов И. Ф. Средства биологической защиты многоцелевого назначения на основе хлорпроизводных нитробензофуоксана. *Вестник Казанского технологического университета*. 2004;1:103–111.
13. Бузыкин Б. И., Губайдуллин А. Т., Литвинов И. А., Юсупова Л. М. Молекулярная и кристаллическая структура 4,6-дихлор-5-нитробенз-2,1,3-оксодиазол-1-оксида. *Бутлеровские сообщения*. 2005;6(2):29–32.
14. Юсупова Л. М., Бузыкин Б. И., Молодых Ж. В., Фалыхов И. Ф., Абдрахманов И. Ш., Хисамутдинов Г. Х., Беляев П. Г., Угрюмова В. С., Равилов А. З., Юсупова Г. Р., Шарнин Г. П., Булидоров В. В., Свиридов С. И., Анисимова Н. Н. Способ получения смеси 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуоксанов и смесь 4-нитро- и 6-нитро-5,7-дихлорбензофуоксанов обладающая бактерицидной, вирулицидной и спороцидной активностью. Патент РФ № 2051913. Заявл. 22.04.1992. Оpubл. 10.01.1996.
15. Хмельницкий Л. И., Новиков С. С., Годовикова Т. И. Химия фуоксанов: Строение и синтез. М.: Наука, 1996. 383 с.
16. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Москва: МГУ имени М. В. Ломоносова, 2012. 54 с.
17. Yusupova L. M., Garmonov S. Yu., Zakharov I. M., Bykov A. R., Garipov T. V., Falyakhov I. F. Multipurpose biological protection agents based on chlorine derivatives of nitrobenzofuroxan. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2004;1:103–111. (In Russ.).
18. Buzykin V. I., Gubaidullin A. T., Litvinov I. A., Yusupova L. M. Molecular and crystal structure of 4,6-dichloro-5-nitrobenz-2,1,3-oxodiazole-1-oxide. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2005;6(2):29–32. (In Russ.).
19. Yusupova L. M., Buzykin B. I., Molodykh Zh. V., Falyakhov I. F., Abd-rakhmanov I. Sh., Khisamutdinov G. Kh., Belyaev P. G., Ugryumova V. S., Ravilov A. Z., Yusupova G. R., Sharnin G. P., Bulidorov V. V., Sviridov S. I., Anisimova N. N. Method of obtaining a mixture of 4-nitro- and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxanes and a mixture of 4-nitro- and 6-nitro-5,7-dichlorobenzofuroxans having bactericidal, virucidal and sporocidal activity. Patent of the Russian Federation № 2051913. Declared 22.04.1992. Publ. 10.01.1996. (In Russ.).
20. Khmelnicki L. I., Novikov S. S., Godovikova T. I. Chemistry of Furoxans: Structure and Synthesis. Moscow: Nauka, 1996. 383 p. (In Russ.).
21. Tarasevich B. N. IR spectra of the main classes of organic compounds. Moscow: Moscow State University, 2012. 54 p. (In Russ.).

REFERENCES

1. Zefirov O. N., Zefirov N. S. Medical chemistry (Medicinal Chemistry). Methodological foundations for creating drugs. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Himiya = Moscow University Bulletin. Series 2 Chemistry*. 200041(2):103–108. (In Russ.).
2. Alekseeva A. A., Torshkhoeva R. M., Vishneva E. A., Levina Yu. G., Volkov K. S. Combined medications in the treatment of the cough in children. *Pediatricheskaya Farmakologiya = Pediatric pharmacology*. 2011;8(5):98–100 (In Russ.).
3. Novikov V. E., Ilukhin S. A. Influence of hypoxen on acetylsalicylic acid efficiency in acute inflammation. *Experimental and Clinical Pharmacology = Experimental and Clinical Pharmacology*. 2013;76(4):32–35 (In Russ.).
4. Pozhilova E. V., Novikov V. E., Novikova A. V. Pharmacodynamics and clinical applications of preparations based on hydroxypyridine. *Vestnik Smolenskoy Gosudarstvennoy Medicinskoj Akademii = Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2013;12(3):56–66 (In Russ.).
5. Bryndal I., Ledoux-Rak I., Lis T. Search for molecular crystals with NLO properties: 5-Sulfosalicylic acid with nicotinamide and isonicotinamide. *J. Mol. Struct.* 2014;1068(1):77–83.
6. Vagner Kh., Ulrikh-Merzenikh G. Synergy research: creating a new generation of phytopreparations. *Russkij medicinskij zhurnal. Medicinskoe obozrenie*. 2016;3:183–189 (In Russ.).
7. Magerramov A. M., Makhmudov K. T., Kopylovich M. N., Pompeiro A. J. L. Non-covalent interactions in the design and synthesis of new compounds. Moscow: Tekhnosfera, 2016. 624 p. (In Russ.).
8. Fadeev Yu. A., Saltanova E. V. Study of the intermolecular interaction of polar molecules in solid solutions with a disordered microstructure. *Polzunovskiy vestnik*. 2006;2:49–52 (In Russ.).
9. Yusupova L. M., Garmonov S. Yu., Zakharov I. M., Zyкова I. E., Mukhametshina A. M., Falyakhov I. F., Garipov T. V. Biological activity of chlorine derivatives of nitrobenzofuroxan. *Voprosy biologii, mediciny, farmacevticheskoy nauki = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2005;4:45–48 (In Russ.).
10. Buzykin V. I., Garipov T. V., Garipova K. T., Davletshin A. N., Korolev B. A., Molodykh Zh. V., Falyakhov I. F., Yusupova L. M. Acaricidal compound for treating scabies in pets. Patent of the Russian Federation № 20678963. Declared 25.05.1994. Publ. 20.10.1996 (In Russ.).
11. Yusupova L. M., Garmonov S. Yu., Zakharov I. M. et al. Fungicidal and toxicological properties of functionally substituted nitrobenzofuroxans. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(4):27–28. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-40-43>
УДК 615.074.072



Оригинальная статья/Research article

Нейтральные липиды плодов овса посевного (*Avena sativa* L.)

Н. К. Юлдашева¹, С. Д. Гусакова¹, Д. Х. Нуруллаева^{2*}, Н. Т. Фарманова², Р. П. Закирова¹,
Э. Р. Курбанова¹

1 – Институт химии растительных веществ им. академика С. Ю. Юнусова Академии Наук Республики Узбекистан (ИХРВ АН РУз), 100170, Республика Узбекистан, г. Ташкент, Мирзо-Улугбекский район, ул. Мирзо-Улугбека, д. 77

2 – Ташкентский фармацевтический институт (РУз), 100015, город Ташкент, ул. Айбека, д. 45

*Контактное лицо: Нуруллаева Дилобар Хамидовна. E-mail: aurum_dilobar.pp@mail.ru

ORCID: Н. К. Юлдашева – <https://orcid.org/0000-0001-7565-818X>; С. Д. Гусакова – <https://orcid.org/0000-0002-4600-1311>; Д. Х. Нуруллаева – <https://orcid.org/0000-0003-4324-9220>; Н. Т. Фарманова – <https://orcid.org/0000-0002-0250-3379>; Р. П. Закирова – <https://orcid.org/0000-0002-2944-0574>; Э. Р. Курбанова – <https://orcid.org/0000-0003-3799-0725>.

Статья поступила: 28.05.2020. Статья принята в печать: 20.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Липиды широко распространенная в природе группа биологически активных веществ, составляющая основную массу органических веществ всех живых организмов. Они накапливаются в растениях в семенах, а также в плодах и выполняют ряд жизненно важных функций: являются основными компонентами клеточных мембран и энергетическим запасом для организма.

Цель. Исследование нейтральных липидов плодов овса посевного (*Avena sativa* L.).

Материалы и методы. Объектами исследования служили плоды (зерна) овса посевного сорта «Ташкент 1», заготовленные в Республике Узбекистан.

Результаты и обсуждения. Установлено, что нейтральные липиды зерен овса содержат 13 жирных кислот с преобладанием суммы олеиновой, линоленовой и линолевой кислот. Суммарная степень ненасыщенности составило почти 78 %. В ИК спектре МЭЖК наблюдалось полосы поглощения, характерные для этих веществ.

Заключение. По результатам анализа НЛ зерна овса состояли из триацилглицеридов и свободных ЖК, которым сопутствовали углеводороды, фитостеролы, тритерпенолы и токоферолы.

Ключевые слова: липиды, овес посевной, стресс, ИК спектр, жирные кислоты.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Д. Х. Нуруллаева, Н. К. Юлдашева и С. Д. Гусакова проводили исследования по выделению из изучаемого сырья нейтральных липидов, определяли кислотное число и компонентный состав нейтральных липидов. Н. Т. Фарманова, С. Д. Гусакова, Р. П. Закирова и Э. Р. Курбанова принимали участие в концептуализации и методологии исследования, в рецензировании, а также корректировке статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Для цитирования: Юлдашева Н. К., Гусакова С. Д., Нуруллаева Д. Х., Фарманова Н. Т. Нейтральные липиды плодов овса посевного (*Avena sativa* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-40-43>

Neutral Lipids of Oats Fruit (*Avena Sativa* L.)

Nigora K. Yuldasheva¹, Svetlana D. Gusakova¹, Dilobar Kh. Nurullaeva^{2*}, Nodira T. Farmanova²,
Rano P. Zakirova¹, Elvira R. Kurbanova¹

1 – The Institute of the Chemistry of Plant Substances named acad. S. Yu Yunusov of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (ICPS UA RUz), 77, Mirzo-Ulugbek str., Mirzo-Ulugbek district, Tashkent, 100170, Republic of Uzbekistan

2 – Tashkent Pharmaceutical Institute (RUz), 45, Aybek st., Tashkent, 100015, Republic of Uzbekistan

*Corresponding author: Dilobar Kh. Nurullaeva. E-mail: aurum_dilobar.pp@mail.ru

ORCID: Nigora K. Yuldasheva – <https://orcid.org/0000-0001-7565-818X>; Svetlana D. Gusakova – <https://orcid.org/0000-0002-4600-1311>; Dilobar Kh. Nurullaeva – <https://orcid.org/0000-0003-4324-9220>; Nodira T. Farmanova – <https://orcid.org/0000-0002-0250-3379>; Rano P. Zakirova – <https://orcid.org/0000-0002-2944-0574>; Elvira R. Kurbanova – <https://orcid.org/0000-0003-3799-0725>.

Received: 28.05.2020. Revised: 20.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Lipids are a widespread group of biologically active substances in nature, making up the bulk of the organic substances of all living organisms. They accumulate in plants in seeds, as well as in fruits and perform a number of vital functions: they are the main components of cell membranes and the energy reserve for the body.

Aim. Study of neutral lipids of sown oats (*Avena sativa* L.).

Materials and methods. The objects of the study were fruits (grains) of oats of the sown variety "Tashkent 1," harvested in the Republic of Uzbekistan

Results and discussions. Neutral lipids of oat grains have been found to contain 13 fatty acids with a predominance of the sum of oleic, linolenic and linoleic acids. The total degree of unsaturation was almost 78%. Absorption bands characteristic of these substances were observed in the IR spectrum of MEGC.

Conclusion. According to the results of the NL analysis, oat grains consisted of triacylglycerides and free LCDs, which were accompanied by hydrocarbons, phytosterols, triterpenoids and tocopherols.

Keywords: lipids, sown oats, stress, IR spectrum, fatty acids.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Юлдашева Н. К., Гусакова С. Д., Нуруллаева Д. Х., Фарманова Н. Т., 2020

© Yuldasheva N. K., Gusakova S. D., Nurullaeva D. Kh., Farmanova N. T., 2020

Contribution of the authors. Dilobar Kh. Nurullaeva, Nigora K. Yuldasheva and Svetlana D. Gusakova carried out research on the isolation of neutral lipids from the raw materials under study, determined the acid number and the component composition of neutral lipids. Nodira T. Farmanova, Svetlana D. Gusakova, Rano P. Zakirova and Elvira R. Kurbanova took part in the conceptualization and research methodology, in reviewing, as well as in correcting the article. The article was written with the participation of all co-authors. All of the above authors agreed on the final version of the article.

For citation: Yuldasheva N. K., Gusakova S. D., Nurullaeva D. Kh., Farmanova N. T. Neutral lipids of oats fruit (*Avena sativa* L.). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-40-43>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время отечественная фармация характеризуется изысканием и разработкой новых источников лекарственных средств растительного происхождения, которые содержат различные биологически активные вещества, в частности липиды. Липиды широко распространенная в природе группа биологически активных веществ, составляющая основную массу органических веществ всех живых организмов. Они накапливаются в растениях в семенах, а также в плодах и выполняют ряд жизненно важных функций (являются основными компонентами клеточных мембран и энергетическим запасом для организма и т. д.). Являющиеся промежуточными продуктами обмена липидов ненасыщенные жирные кислоты имеют достаточно высокую биологическую ценность для организма. В частности, олеиновая кислота принимает участие в регуляции холестеринного обмена, способствует повышению уровня липопротеидов высокой плотности, транспортирует холестерин из тканей в печень для утилизации, линолевая и альфа-линоленовая кислоты являются незаменимыми (эссенциальными) для человека, необходимые для роста, правильного развития головного мозга, органа зрения, половых желез, почек и кожи. Поэтому основным ориентиром пищевой и биологической ценности липидов является их жирнокислотный состав, а особенно содержание незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.

К числу лекарственных растений, содержащих липиды можно отнести и овес посевной (*Avena sativa* L.), который широко используется в научной и народной медицине. Овес (*Avena sativa* L.) – хорошо известная однолетняя культура в умеренном климате. Он признан здоровой пищей в мире, содержащей значительное количество жирорастворимого витамина Е и полиненасыщенных жирных кислот [1]. Высокое содержание в зерне липидов, которые в максимальном количестве находятся в эндосперме, относит овес посевной к потенциально масличной культуре. По сравнению с другими злаками содержание липидов варьируется от 3 до 11 % от массы зерна [2].

До настоящего времени не был изучен липидный состав плодов овса посевного, культивируемого в

Узбекистане. В связи с чем целью данной работы явилось исследование нейтральных липидов плодов овса посевного (*Avena sativa* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили плоды (зерна) овса посевного (*Avena sativa* L.), заготовленные из культивируемого сорта «Ташкент 1» в период полного созревания (Самаркандская область, сентябрь–октябрь, 2017–2018 гг.). После сбора сырье высушивали на воздухе под навесом при температуре 15–20 °С. Образцы сырья определены научным сотрудником Д. З. Бердибаевой Ташкентского ботанического сада имени академика Ф. Н. Русанова. Нейтральные липиды (НЛ) выделяли из измельченного зерна овса экстракцией бензином (температура кипения 72–80 °С) на магнитной мешалке при температуре 60 °С в течение 2 часов в трехкратной повторности. Экстракты объединяли, растворитель упаривали на ротаторном испарителе, выход липидов устанавливали весовым методом. Определяли кислотное число НЛ и по этому показателю рассчитали содержание в них свободных жирных кислот (ЖК) [3]. Из НЛ щелочным гидролизом выделяли неомыляемые вещества. Компонентный состав НЛ устанавливали методом ТСХ на пластинках с силикагелем и пластинках *Silufol*. Для разделения НЛ использовали системы растворителей гексан : эфир (4:1, 3:2 и 7:3). Состав неомыляемых веществ определяли по результатам ТСХ на силикагеле и пластинках *Silufol* в указанных выше системах растворителей. Для идентификации компонентов использовали модельные вещества (фитостеролы, свободные ЖК). Часть НЛ гидролизovali спиртовым раствором щелочи [4], выделенные ЖК метилировали свежеприготовленным раствором диазометана [5]. Метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) очищали от примесей препаративной ТСХ на силикагеле в системе растворителей гексан : эфир (4:1). Зону МЭЖК на сорбенте проявляли парами J_2 , и десорбировали с силикагеля многократным элюированием хлороформом. Хлороформные элюаты объединяли, хлороформ упаривали на ротаторном испарителе. Очищенные МЭЖК растворяли в гексане и анализировали методом ГХ на приборе Agilent 6890N с пламенно-ионизационным детектором, используя капиллярную колонку 30 м × 0,32 мм с неподвижной фазой HP-5, газ-носитель – гелий, температура программирования 150–270 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Результаты проведенных исследований по выделению нейтральных липидов представлены в таблице 1.

Результаты исследований НЛ зерна овса посевного показали, что они состоят в основном из триацилглицеридов и свободных ЖК, которым сопутствовали углеводороды, фитостеролы, тритерпенолы и токоферолы. Также установлено, что основными компонентами неомыляемых веществ являются фитостеролы, в качестве минорных липофильных веществ идентифицировали углеводороды, тритерпенолы и токоферолы.

Из данных таблицы 2 видно, что НЛ плодов овса посевного содержат 13 ЖК с преобладанием суммы олеиновой и линоленовой, а также линолевой кислот. Суммарная степень ненасыщенности составляет почти 78 %. В ИК спектре МЭЖК наблюдалось полосы поглощения, характерные для этих веществ.

Таблица 1. Характеристика нейтральных липидов плодов овса посевного

Table 1. Characterization of neutral lipids of oat grains

№	Показатель Index	Содержание Content
1	Нейтральные липиды (масличность) при фактической влажности, % от массы зерна Neutral lipids (oil content) at actual moisture content, % of grain weight	3,72
2	Кислотное число НЛ, мг КОН/г Acid number NL, mg KOH/g	14,11
3	Свободные жирные кислоты, % от массы НЛ Free fatty acids, % by weight of neutral lipids	7,05
4	Неомыляемые вещества, % от массы НЛ Unsaponifiables, % by weight of neutral lipids	5,1

Таблица 2. Состав жирных кислот нейтральных липидов плодов овса посевного, ГХ, % от массы кислот

Table 2. Content of fatty acids in neutral lipids of oat grains, GC, % of acids weight

№	Жирная кислота Fatty acid	Систематическое название Systematic name	Брутто формула Gross formula	Содержание Content	Температура плавления Melting temperature
1	Лауриновая, 12:0 Lauric 12:0	Додекановая кислота Dodecanoic acid	$C_{11}H_{23}COOH$	0,06	43,2
2	Миристиновая, 14:0 Myristic, 14:0	Тетрадекановая кислота Tetradecanoic acid	$C_{13}H_{27}COOH$	0,36	53,9
3	Пальмитиновая, 16:0 Palmitic, 16:0	Гексадекановая кислота Hexadecanoic acid	$C_{15}H_{31}COOH$	18,51	62,8
4	Пальмитолеиновая, 16:1n7 Palmitoleic, 16:1n7	Цис-9-гексадеценная кислота Cis-9-hexadecenoic acid	$C_{15}H_{29}COOH$	0,34	+0,5
5	Маргариновая, 17:0 Margarine, 17:0	Гептадекановая кислота Heptadecanoic acid	$C_{16}H_{33}COOH$	0,21	61,3
6	Стеариновая, 18:0 Stearin, 18:0	Октадекановая кислота Octadecanoic acid	$C_{17}H_{35}COOH$	2,40	69,6
7	Олеиновая, 18:1n9 Линоленовая, 18:3n3 Olein, 18:1n9 Linolenic, 18:3n3	Цис-9-октадеценная кислота цис,цис,цис-9,12,15-октадекатриеновая кислота Cis-9-octadecenoic acid cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrenoic acid	$C_{17}H_{33}COOH$ $C_{17}H_{29}COOH$	39,80	13–14
8	Линолевая, 18:2n6 Linoleic, 18:2n6	Цис,цис-9,12-октадекадиеновая кислота Cis,cis-9,12-octadecadienoic acid	$C_{17}H_{31}COOH$	36,91	–5
9	Арахидиновая, 20:0 Arachidic, 20:0	Эйкозановая кислота Eicosanoic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	0,27	–49,5
10	Эйкозеновая, 20:1n11 Eikosen 20:1n11	Цис-11-эйкозеновая кислота Cis-11-eicosenoic acid	$C_{19}H_{37}COOH$	0,89	23–24
11	Бегеновая, 22:0 Begen, 22:0	Докозановая кислота Docosanoic acid	$C_{22}H_{44}O_2$	0,12	74–78
12	Лигноцерин, 24:0 Lignocerin, 24:0	Тетракозановая кислота Tetracosan acid	$C_{24}H_{48}O_2$	0,13	84
13	$\sum$ насыщенных ЖК $\sum$ saturated FA			22,06	
14	$\sum$ ненасыщенных ЖК $\sum$ unsaturated FA			77,94	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что проведенные исследования по комплексной оценке нейтральных липидов плодов овса посевного, культивируемого в Узбекистане показали, что изучаемое сырье является богатым источником незаменимых жирных кислот (77,94 %), мажорными компонентами из которых являются суммы олеиновой и линоленовой, а также линолевой кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sterna V., Zute S., Brunava L., Vicupe Z. Lipid composition of oat grain grown in Latvia. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology «Food for Consumer Well-Being» FOODBALT 2014 Conference Proceedings. Jelgava, LLU. 2014:77–80.
2. Banaś A., Debski H., Banaś W., Heneen W. K., Dahlqvist A., Bafor M., Gummeson P.-O., Marttila S., Ekman Å., Carlsson A. S., Stymne S. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58 (10):2463–2470. DOI: 10.1093/jxb/erm125.
3. Руководство по методам исследования, техникохимическому контролю и учету производства в масложировой промышленности. Ленинград: ВНИИ жиров «ВНИИЖ», 1967. 815 с.
4. Ульченко Н. Т., Беккер Н. П., Глушенкова А. И. Липиды и липофильные компоненты надземной части *Daucus sativus*. *Химия природных соединений*. 2000;6:456–458.
5. Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1970. 242 с.

REFERENCES

1. Sterna V., Zute S., Brunava L., Vicupe Z. Lipid composition of oat grain grown in Latvia. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology «Food for Consumer Well-Being» FOODBALT 2014 Conference Proceedings. Jelgava, LLU. 2014:77–80.
2. Banaś A., Debski H., Banaś W., Heneen W. K., Dahlqvist A., Bafor M., Gummeson P.-O., Marttila S., Ekman Å., Carlsson A. S., Stymne S. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58 (10):2463–2470. DOI: 10.1093/jxb/erm125.
3. Guidelines for research methods, technochemical control and accounting for production in the oil and fat industry. Leningrad: VNII zhirov «VNIIZH», 1967. 815 p. (In Russ).
4. Ulchenko N. T., Becker N. P., Glushenkova A. I. Lipids and lipophilic components of the aerial part of *Daucus sativus*. *Himiya prirodnih soedinenij*. 2000;6:456–458. (In Russ).
5. Fieser L., Fieser M. Reagents for organic synthesis. Moscow: Mir, 1970. 242 p. (In Russ).

Технологические аспекты создания лекарственной формы оригинальной субстанции 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана

Г. Э. Бркич¹, Н. В. Пятигорская¹, О. А. Зырянов^{1*}, Н. Б. Дёмина¹, Е. О. Бахрушина¹, И. И. Краснюк¹

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

*Контактное лицо: Зырянов Олег Анатольевич. E-mail: zurianov2009@gmail.com

ORCID: Г. Э. Бркич – <https://orcid.org/0000-0002-3469-9062>; Н. В. Пятигорская – <https://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; О. А. Зырянов – <https://orcid.org/0000-0001-9038-8720>; Н. Б. Дёмина – <http://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; И. И. Краснюк – <http://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 03.03.2020. Статья принята в печать: 08.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Инновационная фармацевтическая субстанция на основе производного 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана обеспечивает продолжительную активацию AMPA-рецепторов и выработку нейротрофических факторов, что позволяет использовать его для терапии когнитивных нарушений и реабилитации пациентов, перенесших острую гипоксию мозга. Учитывая, что данная субстанция способна всасываться через стенки желудочно-кишечного тракта и проходить через гематоэнцефалический барьер, ограничений при разработке пероральной лекарственной формы не существует. Кроме того, пероральная лекарственная форма имеет значительные преимущества при применении в гериатрической и педиатрической практике.

Цель. Цель работы заключалась в проведении сравнительного исследования возможности применения желатиновых и гипромеллозных капсул для разработки состава и технологии получения лекарственной формы, содержащей фармацевтическую субстанцию на основе производного 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана.

Материалы и методы. Изучение теста «Растворение» желатиновых и гипромеллозных капсул проводили на аппарате ERWEKA DT 720 «Лопастная мешалка» при скорости вращения мешалки 50 об/мин в трех средах: pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8. Содержание субстанции в каждой пробе определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Результаты и обсуждение. Приведены результаты разработки и испытаний капсул, содержащих оригинальную фармацевтическую субстанцию ноотропного действия на основе производного 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана, обладающую низкими фармацевтико-технологическими характеристиками, практически не растворимую в воде. Значение D/S составило $\geq 250,00$ мл в каждом физиологическом диапазоне pH. Результаты определения растворения разработанной лекарственной формы в трех средах при значениях pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8 показали положительное влияние использованной технологии на растворимость субстанции.

Заключение. Показано существенное увеличение растворимости практически нерастворимой субстанции производного 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана в разработанной лекарственной форме, что является результатом применения обоснованного комплекса вспомогательных веществ и технологии влагоактивизированного гранулирования. Согласно полученным результатам за 45 минут в среду растворения с pH 4,5 переходит $(77,60 \pm 2,50)$ % субстанции. Результаты исследования используются для разработки технологической схемы получения лекарственной формы, ее показателей и норм качества.

Ключевые слова: производное 3,7-дизабиклононана, фармацевтическая разработка, тест «Растворение», модулятор AMPA-рецептора, желатиновые и гипромеллозные капсулы.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Г. Э. Бркич, Н. В. Пятигорская осуществили дизайн исследования, провели анализ полученных данных. О. А. Зырянов осуществил обзор публикаций, оформил рукопись и перевод. Е. О. Бахрушина выполнила экспериментальные исследования и подготовила рукопись. Н. Б. Дёмина, И. И. Краснюк провели анализ полученных данных, осуществили проверку конечной версии рукописи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза НИЛ медицинской химии МГУ, кандидату химических наук Палюлину Владимиру Александровичу; старшему научному сотруднику кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза НИЛ медицинской химии МГУ, кандидату химических наук Лаврову Мстиславу Игоревичу и Запольскому Максиму Эдуардовичу за оказанную помощь при проведении данного исследования. Исследования были выполнены в рамках государственного контракта № 14.N 08.11.0137 от 28 апреля 2017 г. «Доклинические исследования лекарственного средства на основе производных бициклононана для реабилитации больных после повреждения мозга» и при поддержке проекта «Повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров 5–100».

Для цитирования: Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Зырянов О. А., Дёмина Н. Б., Бахрушина Е. О., Краснюк И. И. Технологические аспекты создания лекарственной формы оригинальной субстанции 3,7-дизабикло[3.3.1]нонана. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-44-52>

Technologic Considerations of Creation Dosage Form of Original Substance 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane

Galina E. Brkich¹, Natalia V. Pyatigorskaya¹, Oleg A. Zyryanov^{1*}, Natalia B. Demina¹, Elena O. Bakhrushina¹, Ivan I. Krasnyuk¹

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: Oleg A. Zyryanov. E-mail: zurianov2009@gmail.com

ORCID: Galina E. Brkich – <https://orcid.org/0000-0002-3469-9062>; Natalia V. Pyatigorskaya – <https://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; Oleg A. Zyryanov – <https://orcid.org/0000-0001-9038-8720>; Natalia B. Demina – <http://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Ivan I. Krasnyuk – <http://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 03.03.2020. Revised: 08.09.2020. Published: 24.11.2020

© Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Зырянов О. А., Дёмина Н. Б., Бахрушина Е. О., Краснюк И. И., 2020
© Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Zyryanov O. A., Demina N. B., Bakhrushina E. O., Krasnyuk I. I., 2020

Abstract

Introduction. An innovative pharmaceutical substance based on the 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivative provides long-term activation of AMPA receptors and the production of neurotrophic factors, which makes it possible to use it for the treatment of cognitive impairments and rehabilitation of patients who have undergone acute brain hypoxia. Given that this substance is able to be absorbed through the walls of the gastrointestinal tract and pass through the blood-brain barrier, there are no restrictions on the development of an oral dosage form. In addition, the oral dosage form has significant advantages when used in geriatric and pediatric practice.

Aim. The aim of the work was to carry out a comparative study of the possibility of using gelatin and hypromellose capsules for the development of the composition and technology for obtaining a dosage form containing a pharmaceutical substance based on a 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivative.

Materials and methods. The study of the «Dissolution» test of gelatinous and hypromellose capsules was carried out on an ERWEKA DT 720 «Paddle stirrer» apparatus at a stirrer rotation speed of 50 rpm in three media: pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8. The content of the substance in each sample was determined by high performance liquid chromatography with UV detection.

Results and discussion. The results of the development and testing of capsules containing an original pharmaceutical substance of nootropic action based on a derivative of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane, which has low pharmaceutical and technological characteristics and is practically insoluble in water, are presented. The D/S value was ≥ 250.00 ml in each physiological pH range. The results of determining the dissolution of the developed dosage form in three media at pH values of 1.2, 4.5 and 6.8 showed a positive effect of the technology used on the solubility of the substance.

Conclusion. A significant increase in the solubility of the practically insoluble substance of the 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane derivative in the developed dosage form was shown, which is the result of the use of a well-founded complex of excipients and the technology of moisture-activated granulation. According to the results obtained, (77.60 ± 2.50) % of the substance passes into the dissolution medium with a pH of 4.5 in 45 minutes. The research results are used to develop a technological scheme for obtaining a finished dosage form, its indicators and quality standards.

Keywords: derivative of the 3,7-diazabicyclononane, pharmaceutical development, dissolution test, AMPA receptor modulator, gelatin and hypromellose capsules.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Galina E. Brkich, Natalia V. Pyatigorskaya have carried out the design of the study, analyzed of the obtained data. Oleg A. Zyryanov have reviewed publications, designed the manuscript and translated. Elena O. Bakhrushina has performed experimental research and prepared the manuscript. Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk have analyzed the obtained data and checked the final version of the manuscript. All authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors are grateful to the leading researcher of the Department of Medicinal Chemistry and Fine Organic Synthesis of the Research Laboratory of Medicinal Chemistry of Moscow State University, Candidate of Chemical Sciences Vladimir A. Palyulin; Senior Researcher of the Department of Medicinal Chemistry and Fine Organic Synthesis of the Research Laboratory of Medicinal Chemistry, Moscow State University, Candidate of Chemical Sciences Mstislav I. Lavrov and Maksim E. Zapolovich for the assistance provided during this study.

The studies were carried out under the state contract No. 14.N 08.11.0137 dated April 28, 2017 «Preclinical studies of a drug based on bicyclononane derivatives for the rehabilitation of patients after brain injury» and with the support of the project «Increasing the competitiveness of leading Russian universities among the world's leading scientific and educational centers 5–100».

For citation: Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Zyryanov O. A., Demina N. B., Bakhrushina E. O., Krasnyuk I. I. Technologic considerations of creation dosage form of original substance 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-44-52>

ВВЕДЕНИЕ

Фармацевтическая субстанция (ФС) на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана (ТСТ-9) обеспечивает продолжительную активацию АМРА-рецепторов и выработку нейротрофических факторов, что позволяет использовать его для терапии когнитивных нарушений и реабилитации пациентов, перенесших острую гипоксию мозга вследствие ишемии, или другие повреждения головного мозга, например травму [1, 2].

ФС является оригинальной по структуре и способу получения. Разработчиками фармацевтической субстанции экспериментально были определены и оценены физико-химические и биологические свойства ФС ТСТ-9, способные повлиять на технологические свойства в условиях промышленного производства, в том числе растворимость, размер частиц, сыпучесть, насыпная плотность и др., фармакологическое действие [3].

С учетом физико-химических характеристик ФС ТСТ-9 в качестве лекарственной формы (ЛФ) были выбраны твердые капсулы. Эта лекарственная форма

маскирует неприятные вкус и запах лекарственных и вспомогательных веществ, обеспечивает высокую точность дозирования, а главное – ФС при наполнении в капсулы не подвергается агрессивному технологическому воздействию (как при гранулировании и прессовании таблетированных ЛФ), что положительно сказывается на стабильности и эффективности лекарственного препарата.

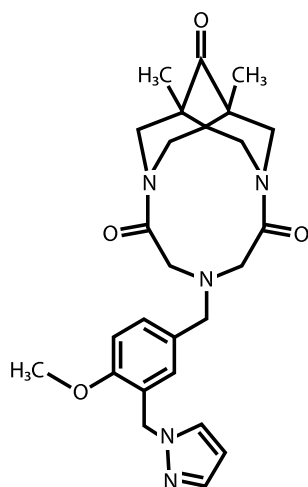
Производители отмечают также экономичность производства капсулированных лекарственных препаратов по сравнению с производством таблеток за счет снижения количества технологических стадий и видов необходимого производственного оборудования [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фармацевтическая субстанция на основе производного 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонана с химическим названием ИУРАС 6-[4метокси-3-(1Н-пирозол-1-илметил) бензил]-1,11диметил-3,6,9-триазатри-

цикло[7.3.1.1] тетрадекан-4,8,12-триона была впервые синтезирована на химическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова [1] (рисунок 1).



Эмпирическая формула: $C_{25}H_{31}N_5O_4$
Молекулярная масса: 465,54 г/моль
Empirical formula: $C_{25}H_{31}N_5O_4$
Molecular weight: 465.54 g/mol

Рисунок 1. Структурная формула 6-[4-метокси-3-(1H-пиразол-1-илметил) бензил]-1,11-диметил-3,6,9-триазатрицикло[7.3.1.1] тетрадекан-4,8,12-трион

Figure 1. Schematic of the molecular structure of 6-[4-methoxy-3-(1H-pyrazol-1-ylmethyl) benzyl]-1,11-dimethyl-3,6,9-triazatricyclo[7.3.1.1] tetradecan-4,8,12-trione

ФС ТСТ-9 представляет собой белый аморфный порошок без запаха. Хорошо растворима в хлороформе, ацетонитриле, хлористом метиле, ацетоне, диметилсульфоксиде, диметилформамиде, этиловом и метиловом спирте. Малорастворима в диэтиловом эфире, диоксане. Практически нерастворима в воде очищенной. Определение биофармацевтической растворимости ФС ТСТ-9 проводили методом встряхивания в термостатируемой колбе. Испытание проводили в течение 24 ч, при постоянной температуре 37 °С, в трех средах при значениях pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8. Значение D/S составило $\geq 250,00$ мл в каждом физиологическом диапазоне pH. Полученные данные по растворению позволяют отнести субстанцию к II/IV классу по Биофармацевтической классификационной системе. Возможно именно низкая растворимость ФС ТСТ-9 служит фактором, лимитирующим ее всасывание.

Усредненные результаты определения технологических характеристик порошка ФС ТСТ-9, полученные в результате измерений 6 образцов, приведены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствовали о низких технологических свойствах субстанции (сыпучесть, угол откоса, насыпная плотность). Кроме того, порошок пылил и электризовался. На основании рассчитанных величин индексов Карра и Хауснера сы-

пучесть субстанции была оценена как «очень плохая». С учетом малой дозировки субстанции, которая обуславливает введение в состав лекарственной формы наполнителей, порошковую смесь перед наполнением в капсулы необходимо было гранулировать [3].

Таблица 1. Технологические характеристики порошка и гранулята ФС ТСТ-9

Table 1. Technological characteristics of powder and granulate API TST-9

Показатель, ед. изм. Indicator, units rev	Порошок Powder	Гранулят Granulate
Размеры частиц Particle size	Менее 100 мкм Less than 100 μ m	От 100 до 315 мкм 100 to 315 μ m
Сыпучесть, г/с Free flow, g/s	1,70 $\pm$ 0,20*	5,91 $\pm$ 0,04
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density before compaction, g / ml	0,15 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Bulk density after compaction, g/ml	0,24 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,03
Угол естественного откоса, град. Angle of repose, degrees	45,00 $\pm$ 3,00	35,00 $\pm$ 2,00
Влажность, % Humidity, %	0,22 $\pm$ 0,30	0,22 $\pm$ 0,04
Индекс Карра Carr index	37,40 $\pm$ 0,20	13,72 $\pm$ 0,02
Индекс Хауснера Hausner index	1,59 $\pm$ 0,20	1,16 $\pm$ 0,02

Примечание. *Полученная величина – при диаметре отверстия воронки 10 мм.

Note. *The resulting value – with a funnel hole diameter of 10 mm.

Усредненные результаты измерений технологических характеристик 6 образцов гранулята ФС ТСТ-9 приведены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствовали о хороших технологических свойствах гранулята: сыпучесть по сравнению с субстанцией повысилась от 1,70 до 5,91 г/с, насыпная плотность до уплотнения возросла от 0,15 до 0,44 г/мл, насыпная плотность после уплотнения – от 0,24 до 0,51 г/мл. На основании рассчитанных величин индексов Карра и Хауснера сыпучесть субстанции была оценена как «хорошая».

Для инкапсулирования ФС ТСТ-9 использовали капсулы желатиновые и капсулы из ГПМЦ размером № 3 производства CAPSUGEL [6]. Состав на одну капсулу представлен в таблице 2.

Тест «Растворение» для двух типов капсул проводили на аппарате ERWEKA DT 720 «Лопастная мешалка» при скорости вращения мешалки 50 об/мин в трех средах: с pH 1,2–0,1 М раствор хлороводородной кислоты (х.ч., ООО «Сигма Тек», Россия) каталожный № ООН 1789; с pH 4,5 – ацетатный буфер (х.ч., ООО «Сигма Тек», Россия) каталожный S7899; с pH 6,8 фосфатный буфер (Gibco, Thermo Scientific, Герма-

ния) каталожный № P5244. Поскольку фармацевтическая субстанция не растворима в воде, в среду добавляли 1 % твин-80 (Panreac, Италия, каталожный № P8192), что допускается Государственной фармакопеей XIV издания (ГФ XIV). При внесении 1 % твин-80 достигалась оптимальная доля растворимости ФС, и обеспечивалось отсутствие отрицательного влияния на дальнейшем определении качественных и количественных характеристики ФС методом ВЭЖХ. Объем среды растворения 500 мл (рН 1,2) и 800 мл (рН 4,5 и рН 6,8), температура среды растворения (37 ± 0,5) °С. Среда растворения готовили в соответствии с ГФ XIV ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» [7].

Таблица 2. Состав лекарственной формы ТСТ-9 на капсулу

Table 2. Composition of the TST-9 dosage form per 1 capsule

Наименование Name	Спецификация/ производитель Specification/ manufacturer	Содержание Content	
		мг mg	%
ФС ТСТ-9 API TST-9	Спецификация разработчика Developer Specification	15,00	7,14
Альгинат натрия Sodium alginate	EPh Protanal CR8133* FMC BioPolymer, США	130,00	61,91
Прежелатинизированный кукурузный крахмал (ПКК) Pregelatinized corn starch (PCA)	EPh LycatabPGS*Roquette, Франция (France)	35,00	16,67
Натрия крахмала гликолят Sodium starch glycolate	EPh Vivastar P* JRS PHARMA GmbH&Co.KG	10,00	4,76
Кремния диоксид коллоидный Colloidal silicon dioxide	EPh Evonik Resource Efficiency GmbH	10,00	4,76
Кальция хлорид гексагидрат Calcium chloride hexahydrate	ФС.2.2.0024.18 Pharmacopoeial monograph 2.2.0024.18	10,00	4,76
Итого Total		210,00	100,00
Масса наполненной капсулы Weight of the filled capsule		300,00–310,00	

Поскольку объектом исследования являлась новая оригинальная ФС, для детального изучения профиля растворения не ограничивались одной точкой отбора проб в 45 минут. Профили растворения должны состоять не менее чем из трех точек, исключая нулевую, поэтому пробы отбирали через 5, 10, 15, 30 и 45 минут порциями по 10 мл. Такой же объем соответствующего буферного раствора добавлялся в среду растворения для сохранения объема. Отбор проб осуществляли из зоны сосуда для растворения, находящейся между поверхностью среды растворения и верхней частью лопасти мешалки и на расстоянии не менее 1 см от стенок сосуда для растворения. Полу-

ченные пробы охлаждали при комнатной температуре, фильтровали через бумажный фильтр типа «синяя лента», отбрасывая первые 5 мл фильтрата. Определяли содержание субстанции в каждой пробе методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Требование по показателю «количественное содержание»: содержание не менее 99,85 и не более 102,00 % в пересчете на сухое и свободное от органических растворителей вещество. Для получения статистически достоверных результатов исследование проводили на 6 образцах желатиновых и ГПМЦ капсул. Условия хроматографического анализа представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Условия хроматографического анализа

Table 3. Chromatographic analysis conditions

Колонка: Column:	Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм ID, 2,7 мкм, Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 50 мм ID, 2,7 μm, Agilent
Элюент А: Eluent A:	0,1 % трифторуксусная кислота (ТФУ) в ацетонитриле («Panreac» кат. № 221881.1612) 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) in acetonitrile («Panreac» № 221881.1612)
Элюент В: Eluent B:	0,1 % трифторуксусная кислота в воде («Panreac» кат. № 363317.1608) 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) in water («Panreac» № 363317.1608)
Объем пробы: Sample volume:	20 мкл/промывка иглы 100 % ацетонитрилом 20 μl/flushing the needle with 100 % acetonitrile
Скорость потока: Flow rate:	1,0 мл/мин 1.0 ml/min
Время хроматографирования: Chromatography time:	12 мин 12 minutes
Температура колонки: Column temperature:	25 °С
Температура автосамплера: Autosampler temperature:	4 °С
Длина волны детектора: Detector Wavelength:	233 нм 233 nm

Таблица 4. Режим хроматографического элюирования

Table 4. Chromatographic elution mode

Градиент элюирования Elution gradient		
Время, мин Time, minutes	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0	0,0	100,0
1,0	0,0	100,0
7,0	100,0	0,0
9,0	100,0	0,0
9,1	0,0	100,0
12,0	0,0	100,0

Элюент А представлял собой 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) в ацетонитриле, затем готовили элюент В – 0,1 % раствор ТФУ в воде. Также готовили раствор 3–50 % раствор ацетонитрила. При-

готовление стокового раствора СО: 10 мг ФС ТСТ-9 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 9 мл раствора 3, перемешивали до полного растворения навески, довели объём раствором 3 до метки. Приготовление стандартного раствора: 100 мкл стокового раствора СО ФС ТСТ-9 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, довели объём раствором 3 до метки. Конечная концентрация составляла 10 мкг/мл. Раствор использовали свежеприготовленным. Приготовление бланк-раствора: 130 мг альгината натрия, 35 мг прежелатинизированного кукурузного крахмала, 10 мг натрия крахмала гликолята, 10 мг кремния диоксида коллоидного и 10 мг кальция хлоридагексагидрата помещали в стакан вместимостью 10 мл, прибавляли 9 мл раствора 3 и перемешивали до максимального растворения компонентов. Полученный раствор довели раствором 3 до метки. Аналитическую пробу в объеме 100 мкл помещали в микропробирку вместимостью 0,5 мл, центрифугировали на лабораторной центрифуге фирмы Eppendorf 16873g, ротор FA-45-18-11 в течение 2 мин при 14 000 об/мин для осаждения нерастворимых компонентов. Супернатант использовали для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения достоверных результатов теста растворение (ТР) ФС ТСТ-9 из ГПМЦ капсул в раствор с pH 1,2 (0,1 М раствор хлороводородной кислоты, 1 % твин-80) был построен калибровочный график, представленный на рисунке 2. Усредненные результаты высвобождения, полученные на основании изучения 6 образцов, приведены в таблице 5 и на рисунках 3 и 4.

Результаты определения ТР показывают существенное улучшение растворимости нерастворимой субстанции, полученной в результате использованной технологии гранулирования: за 45 минут в среду растворения pH 1,2 переходит в среднем $64,75 \pm 3,00$ % ФС ТСТ-9. Однако полученный результат оказался не удовлетворительным. Отсутствие растворения в первые 5 минут обусловлено тем, что распа-

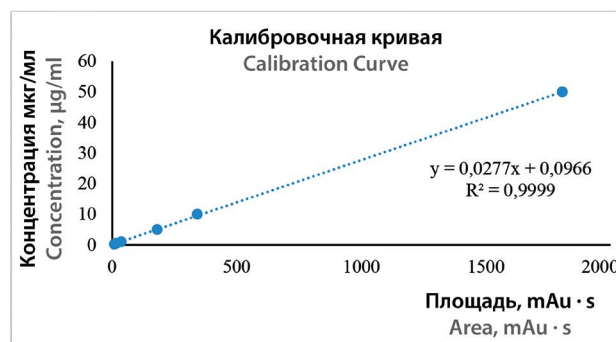


Рисунок 2. Калибровочный график ФС ТСТ-9 в среде хлороводородной кислоты с pH 1,2 с 1 % содержанием твина-80

Figure 2. Calibration graph of AIP TST-9 in hydrochloric acid medium with pH 1.2 with 1 % Tween-80 content

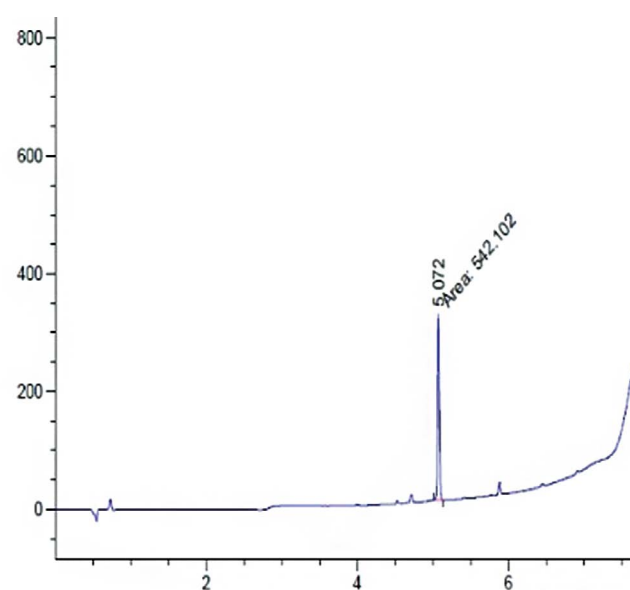


Рисунок 3. Хроматограмма проведения ТР ГПМЦ капсул в среде хлороводородной кислоты с pH 1,2. Ось абсцисс – величина сигнала, mAU, ось ординат – время выхода, мин

Figure 3. Chromatogram of the dissolution test HPMC capsules in hydrochloric acid medium with pH 1.2. The abscissa is the signal value, mAU, the ordinate is the exit time, min

Таблица 5. Высвобождение ФС ТСТ-9 из ГПМЦ капсул в среду с pH 1,2

Table 5. Drug release of API TST-9 from HPMC capsules into a medium with pH 1.2

Образец Sample	Высвобождение, % Drug release, %					
	5 мин 5 minutes	10 мин 10 minutes	15 мин 15 minutes	20 мин 20 minutes	30 мин 30 minutes	45 мин 45 minutes
1	1,05 ± 1,00	35,90 ± 1,80	50,15 ± 2,50	61,87 ± 2,90	63,36 ± 2,90	64,75 ± 3,00
2	1,56 ± 1,00	37,85 ± 1,90	52,43 ± 2,60	63,57 ± 3,10	65,78 ± 3,20	66,12 ± 3,30
3	2,31 ± 2,00	38,01 ± 1,90	54,12 ± 2,70	65,71 ± 3,20	69,41 ± 3,40	72,34 ± 3,60
4	1,98 ± 2,00	35,61 ± 1,70	52,97 ± 2,60	58,39 ± 2,90	60,12 ± 3,00	61,18 ± 3,00
5	1,75 ± 2,00	34,87 ± 1,70	49,65 ± 2,50	60,72 ± 3,00	60,98 ± 3,00	62,17 ± 2,80
6	1,65 ± 1,00	36,20 ± 1,80	50,81 ± 2,50	61,98 ± 3,00	62,13 ± 2,90	62,34 ± 2,90

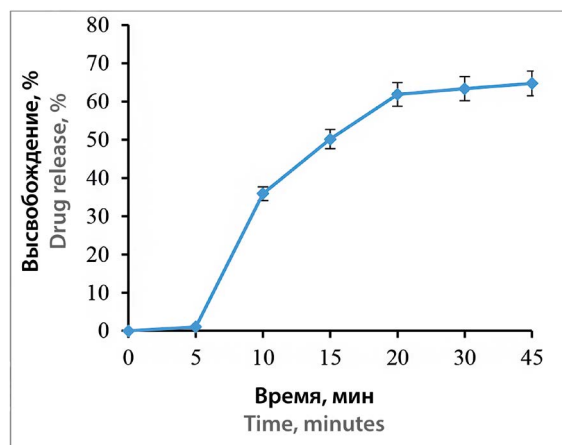


Рисунок 4. Усредненный профиль растворения ЛФ (ГПМЦ капсулы) ТСТ-9 15 мг в среде хлороводородной кислоты с pH 1,2 с 1 % содержанием твина-80

Figure 4. Average dissolution profile of the dosage form (HPMC capsules) TST-9 15 mg in hydrochloric acid medium with pH 1.2 with 1 % Tween-80 content

даемость ГПМЦ капсул в среде с pH 1,2 в среднем составило 300 ± 30 с, а в средах с более высоким значением pH превышало эту величину. Распадаемость желатиновых капсул в указанных средах составила от 1 до 3 минут. Поэтому в дальнейшем эксперименте капсулы из гипромеллозы не были использованы, а исследования проводились только на капсулах из желатина.

Результаты проведения теста растворения желатиновых капсул в среде с pH 1,2 приведены в таблице 6 и на рисунках 5 и 6.

Данные таблицы 6 и рисунка 6 демонстрируют улучшение кинетики растворения из желатиновых капсул по сравнению с ГПМЦ капсулами из-за быстрого перехода субстанции в среду растворения на начальном этапе. Полученные результаты выше результатов растворения субстанции, но не обеспечивают фармакопейных стандартов растворения (в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») в среде с pH 1,2.

Таблица 6. Высвобождение ФС ТСТ-9 из желатиновых капсул в среду с pH 1,2

Table 6. Drug release of API TST-9 from gelatin capsules into a medium with pH 1.2

Образец Sample	Высвобождение, % Drug release, %					
	5 мин 5 minutes	10 мин 10 minutes	15 мин 15 minutes	20 мин 20 minutes	30 мин 30 minutes	45 мин 45 minutes
1	25,50 ± 1,80	44,60 ± 2,20	49,60 ± 1,90	55,60 ± 1,50	60,50 ± 2,10	62,50 ± 1,90
2	23,20 ± 1,60	45,80 ± 2,40	50,50 ± 1,80	57,10 ± 1,70	59,20 ± 1,90	60,20 ± 1,80
3	25,80 ± 1,50	44,70 ± 2,30	52,10 ± 1,70	57,90 ± 1,60	59,80 ± 1,80	63,80 ± 2,00
4	20,30 ± 1,70	42,90 ± 2,50	50,50 ± 1,80	55,10 ± 1,90	58,30 ± 1,70	59,30 ± 1,40
5	23,00 ± 1,20	47,20 ± 2,60	54,90 ± 1,70	59,20 ± 1,60	60,00 ± 2,00	63,00 ± 1,40
6	24,20 ± 1,40	49,50 ± 2,60	52,20 ± 1,70	58,60 ± 1,80	61,20 ± 1,90	62,20 ± 1,60

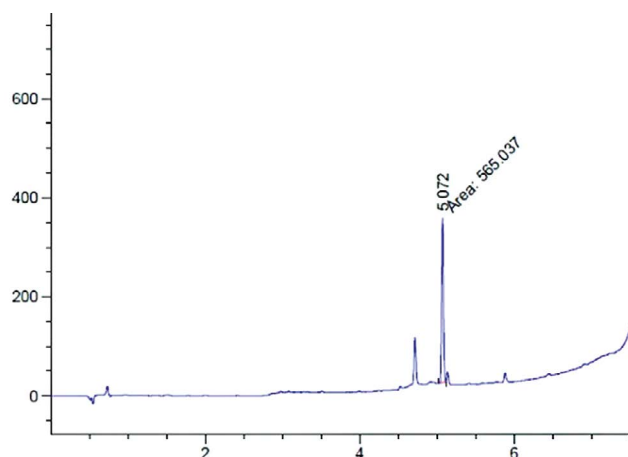


Рисунок 5. Хроматограмма проведения ТР желатиновых капсул в среде хлороводородной кислоты с pH 1,2. Ось абсцисс – величина сигнала, mAU, ось ординат – время выхода, мин

Figure 5. Chromatogram of the dissolution test of gelatin capsules in hydrochloric acid medium with pH 1.2. The abscissa is the signal value, mAU, the ordinate is the exit time, min

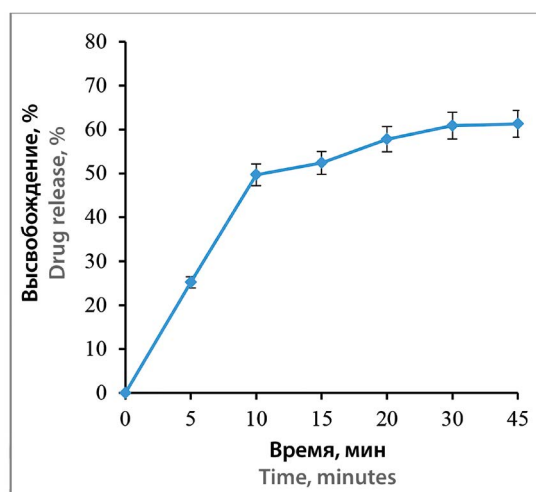


Рисунок 6. Усредненный профиль растворения ЛФ (желатиновые капсулы) ТСТ-9 15 мг в среде хлороводородной кислоты с pH 1,2 с 1 % содержанием твина-80

Figure 6. Average dissolution profile of the dosage form (gelatin capsules) TST-9 15 mg in hydrochloric acid medium with pH 1.2 with 1 % Tween-80 content

Результаты изучения кинетики растворения желатиновых капсул в среде с pH 4,5 представлены в таблице 7 и на рисунках 8 и 9. Для получения достоверных результатов ТР ФС ТСТ-9 была построена калибровочная кривая, представленная на рисунке 7.

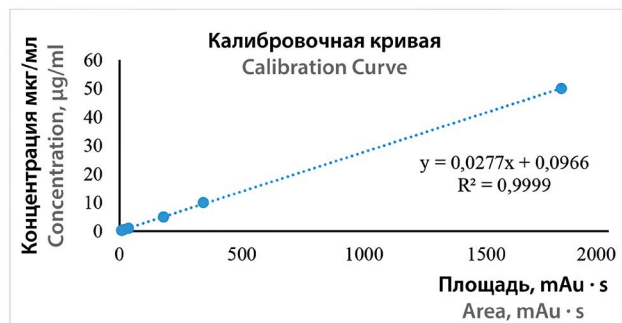


Рисунок 7. Калибровочный график ФС ТСТ-9 в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5

Figure 7. Calibration graph of API TST-9 in an acetate buffer solution pH 4.5

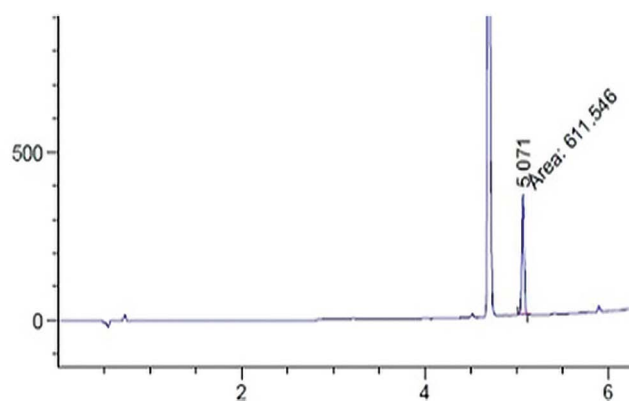


Рисунок 8. Хроматограмма проведения ТР желатиновых капсул в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5. Ось абсцисс – величина сигнала, mAU, ось ординат – время выхода, мин

Figure 8. Chromatogram of the dissolution test of gelatin capsules in an acetate buffer solution pH 4.5. The abscissa is the signal value, mAU, the ordinate is the exit time, min

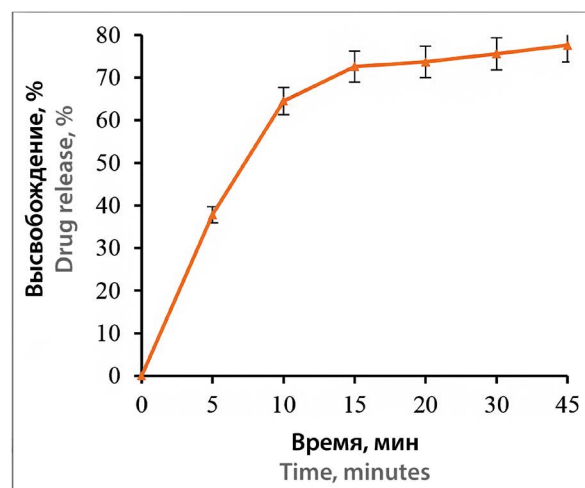


Рисунок 9. Усредненный профиль растворения ЛФ (желатиновые капсулы) ТСТ-9 15 мг в среде ацетатного буферного раствора pH 4,5 с 1 % содержанием твина-80

Figure 9. Average dissolution profile of dosage form (gelatin capsules) TST-9 15 mg in an acetate buffer solution pH 4.5 with 1 % Tween-80 content

В среднем высвобождение ФС из желатиновых капсул в среде с pH 4,5 происходит интенсивнее, чем в среде с pH 1,2 и заметно быстрее по сравнению с капсулами из ГПМЦ. Замедление растворения после 15 минут возможно связано с достижением предела растворимости ФСТСТ-9.

Результаты проведения теста «Растворение» в среде с pH 6,8 представлены в таблице 8 и в рисунках 11, 12. Для получения достоверных результатов ТР ФС ТСТ-9 была построена калибровочная кривая, представленная на рисунке 10.

В среде с pH 6,8 также, как и в среде с pH 4,5, происходит интенсивное высвобождение субстанции в первые 5 минут. К 45 минуте в среде растворения обнаружено $79,30 \pm 2,20$ % ФС ТСТ-9, что демонстрирует существенное улучшение растворимости субстанции в разработанной ЛФ.

Таблица 7. Высвобождение ФС ТСТ-9 из желатиновых капсул в среду с pH 4,5

Table 7. Drug release of API TST-9 from HPMC capsules into a medium with pH 4.5

Образец Sample	Высвобождение, % Drug release, %					
	5 мин 5 minutes	10 мин 10 minutes	15 мин 15 minutes	20 мин 20 minutes	30 мин 30 minutes	45 мин 45 minutes
1	37,80 ± 2,10	64,50 ± 3,10	72,60 ± 3,20	73,70 ± 3,50	75,60 ± 3,90	77,60 ± 3,50
2	35,40 ± 1,70	66,20 ± 3,30	69,80 ± 3,40	70,40 ± 3,50	73,50 ± 3,60	79,10 ± 3,70
3	28,90 ± 1,40	61,80 ± 3,00	65,70 ± 3,20	69,30 ± 3,40	71,10 ± 3,50	73,90 ± 3,60
4	40,10 ± 2,00	67,30 ± 3,30	75,90 ± 3,70	76,30 ± 3,80	77,50 ± 3,80	78,10 ± 3,90
5	38,70 ± 1,90	65,00 ± 3,20	71,20 ± 3,50	73,40 ± 3,60	74,90 ± 3,70	77,20 ± 3,60
6	41,50 ± 2,00	69,20 ± 3,40	73,50 ± 3,60	73,90 ± 3,60	74,20 ± 3,70	78,60 ± 3,60

Таблица 8. Высвобождение ФС ТСТ-9 из желатиновых капсул в среду с pH 6,8

Table 8. Release of API TST-9 from gelatin capsules into a medium with pH 6.8

Образец Sample	Высвобождение, % Drug release, %					
	5 мин 5 minutes	10 мин 10 minutes	15 мин 15 minutes	20 мин 20 minutes	30 мин 30 minutes	45 мин 45 minutes
1	35,50 ± 1,70	44,20 ± 2,00	54,40 ± 2,80	58,70 ± 2,90	60,10 ± 2,10	79,30 ± 2,20
2	31,90 ± 1,60	39,70 ± 1,90	52,90 ± 2,60	56,90 ± 2,80	60,70 ± 2,00	78,10 ± 2,20
3	29,40 ± 1,40	38,90 ± 1,90	52,40 ± 2,60	59,10 ± 2,90	61,40 ± 2,00	79,20 ± 2,20
4	30,60 ± 1,40	42,50 ± 2,10	56,10 ± 2,80	61,30 ± 3,00	64,80 ± 2,20	77,70 ± 2,30
5	37,40 ± 1,80	47,80 ± 2,30	55,90 ± 2,80	60,10 ± 3,00	64,10 ± 2,20	79,20 ± 2,30
6	34,80 ± 1,70	45,10 ± 2,20	53,80 ± 2,70	58,60 ± 2,90	62,80 ± 2,10	78,90 ± 2,30

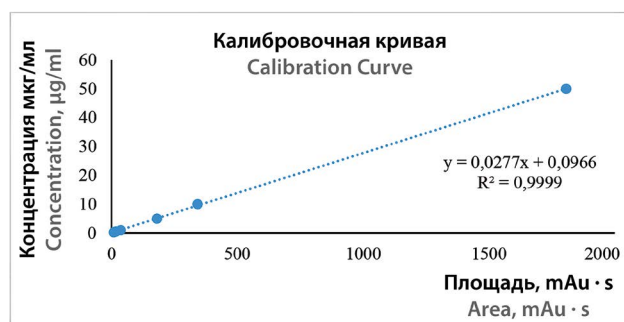


Рисунок 10. Калибровочный график ФС ТСТ-9 в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8

Figure 10. Calibration graph of API TST-9 in the phosphate buffer solution pH 6.8

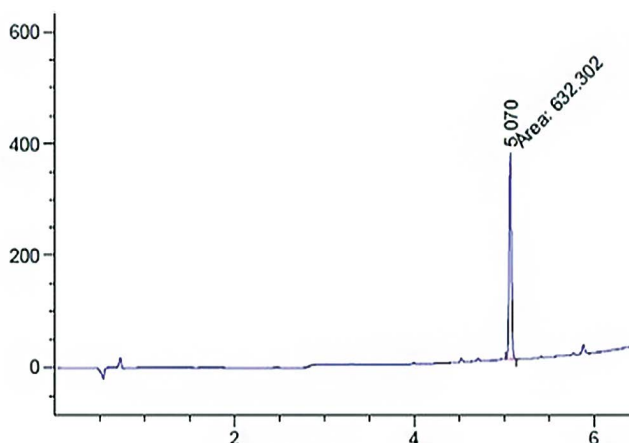


Рисунок 11. Хроматограмма проведения ТР желатиновых капсул в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8. Ось абсцисс – величина сигнала, mAU, ось ординат – время выхода, мин

Figure 11. Chromatogram of the dissolution test of gelatin capsules in a phosphate buffer solution pH 6.8. The abscissa is the signal value, mAU, the ordinate is the exit time, min

Как правило, между скоростью растворения ФС в биологических жидкостях и ее биологической доступностью имеется прямая зависимость. Для практически нерастворимых в воде ФС скорость абсорбции опре-

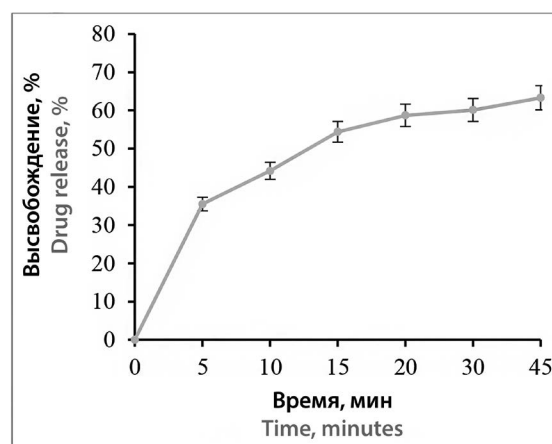


Рисунок 12. Усредненный профиль растворения ЛФ (желатиновые капсулы) ТСТ-9 15 мг в среде фосфатного буферного раствора pH 6,8 с 1 % содержанием Твина-80

Figure 12. Average dissolution profile of dosage form (gelatin capsules) TST-9 15 mg in a phosphate buffer solution pH 6.8 with 1 % Tween-80

деляется скоростью их растворения. Таким образом, повышение растворимости субстанции, возможно, будет способствовать повышению ее биодоступности.

Таким образом, в результате научно-обоснованного выбора состава ЛФ и ее технологии гранулирования отмечено не только увеличение значений фармакопейных показателей капсулируемой массы – угла естественного откоса, сыпучести, насыпной плотности и ее технологических характеристик – индексов Карра и Хауснера, влияющих на технологический процесс, но также существенно повышен профиль растворения субстанции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты определения фармацевтико-технологических характеристик ФС ТСТ-9 показали, что она является практически не растворимой субстанцией с низкими технологическими характеристиками.

Существенное улучшение растворимости ФС в разработанной ЛФ (твердые желатиновые капсулы) и

хорошие технологические характеристики гранулированной субстанции показали перспективность проведенных исследований, которые могут служить основой для детальной разработки технологической схемы получения ЛФ ТСТ-9, её показателей и норм качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запольский М. Э., Лавров М. И., Палюлин В. А., Зефирова Н. С. Патент РФ № RU 2480470 C2. Трициклические производные N, N-замещенных 3,7-дизабизикло[3.3.1]нонанов, потенциально обладающие фармакологической активностью и лекарственные средства на их основе. 2013.
2. Pyatigorskaya N. V., Brkich G. E., Lavrov M. I., Palyulin V. A., Aladysheva Z. I. New AMPA receptor positive modulators for rehabilitation of patients after cerebral accidents. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018;10(5):1103–1106.
3. Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Demina N. B., Zyryanov O. A., Krasnyuk I. I. Scientific and Methodical approach to developing the formulation of an Innovative Medicinal Product based on a derivative of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane (hydrindane). *Research J. Pharm. and Tech.* 2019;12(12):5752–5756.
4. Дёмина Н. Б., Дёмин М. С. Разработка технологии производства капсульных форм лекарственных препаратов. Глава в монографии «Фармацевтическая разработка». Концепция и практические рекомендации. М.: Изд-во Перо. 2015. С. 196–236.
5. Демина Н.Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;(2):56–60.
6. Technical Reference File Hard Gelatin Capsules. 3rd edition. *Capsugel*. 2010. 55 p.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. 2018.

REFERENCES

1. Zapolskiy M. E., Lavrov M. I., Palyulin V. A., Zefirov N. S. RF Patent No. RU 2480470 C2. Tricyclic derivatives of N, N-substituted 3,7-diazabicyclo [3.3.1] nonanes with pharmacological activity and drugs based on them. 2013. (In Russ.).
2. Pyatigorskaya N. V., Brkich G. E., Lavrov M. I., Palyulin V. A., Aladysheva Z. I. New AMPA receptor positive modulators for rehabilitation of patients after cerebral accidents. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018;10(5):1103–1106.
3. Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Demina N. B., Zyryanov O. A., Krasnyuk I. I. Scientific and Methodical approach to developing the formulation of an Innovative Medicinal Product based on a derivative of 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane (hydrindane). *Research J. Pharm. and Tech.* 2019;12(12):5752–5756.
4. Demina N. B., Demina M. S. Development of technology for the production of capsule forms of drugs. Chapter in the monograph *Pharmaceutical Development. Concept and practical recommendations*. Moscow. *Publisher Pero*. 2015. P. 196–236. (In Russ.).
5. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & Registration*. 2017;(2):56–60. (In Russ.).
6. Technical Reference File Hard Gelatin Capsules. 3rd edition. *Capsugel*. 2010. 55 p.
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. 2018. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-53-58>
УДК 66.099.2



Оригинальная статья/Research article

Анализ процесса измельчения в виброкавитационном гомогенизаторе

Е. В. Флисюк¹, С. С. Белокуров¹, И. А. Наркевич¹, О. М. Флисюк², Д. Ю. Ивкин^{1*}

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
2 – Санкт-Петербургский государственный техникум (технический университет) (СПбГТИ (ТУ)), 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26

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

ORCID: Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; С. С. Белокуров – <https://orcid.org/0000-0002-9425-2668>; И. А. Наркевич – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>;
О. М. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8725>; Д. Ю. Ивкин – <http://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Статья поступила: 21.07.2020. Статья принята в печать: 15.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Виброкавитационные гомогенизаторы находят все большее применение в различных отраслях промышленности, в том числе и в фармацевтической – для приготовления кремов, гелей для придания им однородного состава, а в последнее время и для экстрагирования ценных веществ из материалов растительного происхождения. Как было показано нами ранее, сравнение экстрагирования диосцина из семян пажитника сенного, проведенного в аппаратах различных конструкций, при одинаковых условиях организации процесса показало, что наиболее эффективным способом оказался способ экстрагирования в виброкавитационном поле. Очевидно, это связано с тем, что кавитация снижает диффузионное сопротивление процесса и таким образом повышает интенсивность процесса переноса массы вещества из твердой фазы в раствор. Однако процесс экстрагирования в аппаратах такого типа является сложным и сопровождается измельчением семян, что приводит к изменению дисперсного состава твердой фазы. В более ранних работах на примере извлечения диосцина из семян пажитника сенного показано, что повышение частоты вращения ротора увеличивает выход БАВ. Однако тонкое измельчение сырья часто приводит к образованию слоя осадка, загрязняющего раствор балластными веществами и затрудняющего его очистку, а также снижает выход БАВ, поэтому изучение этого процесса является необходимым для регулирования дисперсного состава, чтобы обеспечить наибольшую эффективность экстрагирования в аппаратах такого типа.

Цель. Провести теоретический и экспериментальный анализ процесса измельчения частиц семян пажитника сенного в виброкавитационном гомогенизаторе, сопровождающимся экстрагированием БАВ, а также получить зависимости, позволяющие оценить вклад измельчения при формировании дисперсного состава шрота в данном аппарате и определить средний размер частиц в результате дробления.

Материалы и методы. Первым этапом исследования стал теоретический анализ процесса измельчения, так как он является частным случаем большого класса процессов, в которых дисперсный состав твердой фазы непостоянен. Поэтому в данной работе для математического описания измельчения частиц использована модель, учитывающая кинетические особенности рассматриваемого процесса. Экспериментальное изучение извлечения ценных компонентов из растительного сырья проводилось на лабораторной установке с виброкавитационным гомогенизатором периодического действия. В качестве сырья были использованы семена пажитника сенного, приобретенных в фирме ООО «Стоинг» г. Москва (Россия). Товароведческий анализ показал соответствие сырья требованиям ГФ XIV издания. Исходный водный раствор этанола (объемной концентрацией 60 %) с семенами пажитника сенного загружался в стакан 6, в объеме 0,2 литра, затем ротор аппарата приводился во вращение и выводился на заданную частоту вращения. Опыты проводились в виброкавитационном гомогенизаторе, который представляет лабораторный образец аппарата, изготовленного в СПбГТИ(ТУ), состоящий из статора и ротора, вращающегося при частоте вращения – 1000, 3000 и 5000 об/мин (16,7; 50 и 83,3) 1/с. При каждом значении частоты вращения ротора время процесса варьировалось в диапазоне от 0 до 50 минут, причем процесс вел в течение 60, 120, 180, 240 и 300 секунд. Исследования проведенные в течение 5 минут и более показали, что дисперсный состав шрота практически не изменяется во времени, но существенно зависит от частоты вращения ротора. Таким образом, после 5 минут наступает некая стабилизация дисперсного состава и дальнейшее пребывание материала в аппарате не приводит к заметному изменению дисперсного состава. После каждого опыта шрот отбирали, высушивали и проводили ситовой анализ дисперсного состава.

Результаты и обсуждение. По результатам, полученным при обработке экспериментальных данных по уравнению, были рассчитаны значения средней вероятности измельчения частиц и, как оказалось, она практически не зависит от времени, а зависит только от частоты вращения ротора. Была получена зависимость изменения средней вероятности измельчения частиц при различной частоте вращения ротора. Анализ этих результатов показал, что величина средней вероятности измельчения частиц в кавитационном гомогенизаторе увеличивается с повышением частоты вращения ротора, что вполне ожидаемо, так как возрастает частота контактов частиц с рабочими органами аппарата. Кроме того, полученная зависимость для средней вероятности измельчения частиц имеет линейный характер. Данное выражение достаточно точно описывает значения изменения во времени относительной массы частиц в рабочем диапазоне $n = 16,7 - 83,3$ 1/с. С учетом этих значений экспериментальные и расчетные результаты имеют хорошее совпадение.

Заключение. Предложенный подход и полученные результаты могут быть использованы для оценки дисперсного состава частиц, получаемых и в других конструкциях аппаратов подобного действия.

Ключевые слова: гомогенизатор, ротор, статор, виброкавитация, измельчение, средняя масса, частицы, частота вращения, пажитник сенный.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич, О. М. Флисюк и Д. Ю. Ивкин придумали и разработали эксперимент. С. С. Белокуров провел эксперименты по измельчению семян пажитника сенного в виброкавитационном гомогенизаторе. Авторы С. С. Белокуров и Е. В. Флисюк и О. М. Флисюк участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в написании текста статьи и в обсуждении результатов.

Для цитирования: Флисюк Е. В., Белокуров С. С., Наркевич И. А., Флисюк О. М., Ивкин Д. Ю. Анализ процесса измельчения в виброкавитационном гомогенизаторе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-53-58>

© Флисюк Е. В., Белокуров С. С., Наркевич И. А., Флисюк О. М., Ивкин Д. Ю., 2020

© Flisyuk E. V., Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk O. M., Ivkin D. Yu., 2020

The Analysis of Process of Crushing in the Vibrocavitation Homogenizer

Elena V. Flisyuk¹, Sergey S. Belokurov¹, Igor A. Narkevich¹, Oleg M. Flisyuk², Dmitry Yu. Ivkin^{1*}

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

2 – Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 26, Moskovsky Prospekt, Saint-Petersburg, 190013, Russia

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

ORCID: Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>; Sergey S. Belokurov – <https://orcid.org/0000-0002-9425-2668>; Igor A. Narkevich – <https://orcid.org/0000-0002-5483-6626>; Oleg M. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0003-0527-8725>; Dmitry Yu. Ivkin – <http://orcid.org/0000-0001-9273-6864>.

Received: 21.07.2020. Revised: 15.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Vibration cavitation homogenizers are increasingly used in various industries, including the pharmaceutical industry – for the preparation of creams, gels to give them a homogeneous composition, and more recently for the extraction of valuable substances from plant materials. As we have shown earlier, a comparison of the extraction of dioscin from fenugreek seeds, carried out in devices of various designs, under the same conditions for organizing the process showed that the most effective method was the extraction method in a vibro-cavitation field. Obviously, this is due to the fact that cavitation reduces the diffusion resistance of the process and, thus, increases the intensity of the process of transferring the mass of a substance from the solid phase to the solution. However, the extraction process in apparatus of this type is complex and is accompanied by crushing of seeds, which leads to a change in the dispersed composition of the solid phase.

Aim. Conduct a theoretical and experimental analysis of the process of grinding fenugreek seeds particles in a vibrocavitation homogenizer, accompanied by the extraction of biologically active substances, as well as obtaining dependences that allow evaluating the contribution of grinding to the formation of the dispersed composition of the meal in this apparatus and determining the average particle size as a result of crushing. In earlier works, using the example of the extraction of dioscin from fenugreek seeds, it was shown that an increase in the rotor speed increases the yield of biologically active substances. However, fine grinding of raw materials often leads to the formation of a sediment layer that pollutes the solution with ballast substances and complicates its purification, and also reduces the yield of biologically active substances, therefore, the study of this process is necessary to control the dispersed composition in order to ensure the highest extraction efficiency in devices of this type.

Materials and methods. The first stage of the study was the theoretical analysis of the grinding process, since it is a special case of a large class of processes in which the dispersed composition of the solid phase is not constant. Therefore, in this work, for the mathematical description of particle grinding, a model is used that takes into account the kinetic features of the process under consideration. An experimental study of the extraction of valuable components from plant raw materials was carried out in a laboratory setup with a vibro-cavitation homogenizer of periodic action. As a raw material, we used fenugreek seeds purchased from LLC «Stoing», Moscow (Russia), which we used for research. Commodity analysis showed the compliance of raw materials with the requirements of the GF XIV edition. The initial, aqueous solution of ethanol (volume concentration 60 %) with fenugreek seeds was loaded into glass 6, in a volume of 0.2 liters, then the rotor of the apparatus was brought into rotation and brought to a given rotation frequency. The experiments were carried out at a rotation frequency of 1000, 3000 and 5000 rpm (16.7; 50 and 83.3) 1/s. At each value of the rotor speed, the process time varied in the range from 0 to 50 minutes, and the process was carried out for 60, 120, 180, 240 and 300 seconds. Studies carried out for 5 minutes or more showed that the dispersed composition of the meal practically does not change over time, but significantly depends on the rotor speed. Thus, after 5 minutes, a certain stabilization of the dispersed composition occurs and further residence of the material in the apparatus does not lead to a noticeable change in the dispersed composition. After each experiment, the meal was taken, dried, and sieve analysis of the dispersed composition was carried out.

Results and discussion. Based on the results obtained by processing the experimental data according to the equation, the values of the average probability of particle crushing were calculated and, as it turned out, it practically does not depend on time, but depends only on the rotor speed. The dependence of the change in the average probability of particle grinding at different rotor speed was obtained. The analysis of these results showed that the value of the average probability of particle grinding in the cavitation homogenizer increases with an increase in the rotor speed, which is quite expected, since the frequency of contacts of particles with the working organs of the apparatus increases. In addition, the obtained dependence for the average probability of particle crushing is linear. This Expression quite accurately describes the values of the change in time of the relative mass of particles in the working range $n = 16.7 - 83.3$ 1/s. Taking these values into account, the experimental and calculated results are in good agreement.

Conclusions. The proposed approach and the results obtained can be used to assess the dispersed composition of particles obtained in other designs of devices of similar action.

Keywords: homogenizer, rotor, stator, vibrocavitation, crushing, average weight, particles, rotation frequency, fenugreek.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Elena V. Flisyuk, Sergey S. Belokurov, Igor A. Narkevich, Oleg M. Flisyuk and Dmitry Yu. Ivkin invented and developed an experiment. Sergey S. Belokurov conducted experiments on grinding fenugreek seeds in a vibro-cavitation homogenizer. Authors Sergey S. Belokurov and Elena V. Flisyuk and Oleg M. Flisyuk participated in data processing. All authors participated in writing the text of the article and in the discussion of the results.

For citation: Flisyuk E. V., Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk O. M., Ivkin D. Yu. The analysis of process of crushing in the vibrocavitation homogenizer. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-53-58>

ОБОЗНАЧЕНИЯ

t – время, с; m – масса частицы, кг; $F(x, t)$ – плотность функции распределения частиц по x в единице объема аппарата, 1/кг; n – частота вращения ротора, 1/с; N – число частиц в аппарате; N_0 – число исходных частиц, загружаемых в аппарат; $g(m, n; m-s, s)$ – плотность вероятности дробления частицы массой m на два осколка $m-s$ и s за единицу времени в

единице объема аппарата, 1/(кг · с); $\theta(m, t, n)$ – вероятность дробления частицы массой m на два осколка $m-s$ и s за единицу времени в единице объема аппарата, 1/с; m_0 – средняя масса начальной частицы, кг.

ИНДЕКСЫ

0 – начальный.

ВВЕДЕНИЕ

Виброкавитационные гомогенизаторы находят все большее применение в различных отраслях промышленности, в том числе и в фармацевтической – для приготовления кремов, гелей для придания им однородного состава, а в последнее время и для экстрагирования ценных веществ из материалов растительного происхождения. Как было показано нами ранее [1], сравнение экстрагирования диосцина из семян пажитника сенного, проведенного в аппаратах различных конструкций, при одинаковых условиях организации процесса показало, что наиболее эффективным способом оказался способ экстрагирования в виброкавитационном поле. Очевидно, это связано с тем, что кавитация снижает диффузионное сопротивление процесса и таким образом повышает интенсивность процесса переноса массы вещества из твердой фазы в раствор. Однако процесс экстрагирования в аппаратах такого типа является сложным и сопровождается измельчением семян, что приводит к изменению дисперсного состава твердой фазы.

Как показали предварительные эксперименты, проведенные в виброкавитационном гомогенизаторе [2], в начале процесса интенсивность измельчения частиц наиболее высока при различной частоте вращения ротора, а с течением времени замедляется и дисперсный состав стабилизируется, причем при более высокой частоте вращения быстрее [3]. Таким образом, с течением времени наступает некоторая стабилизация дисперсного состава твердой фазы при постоянстве основных параметров процесса. Измельчение увеличивает поверхность массообмена, что существенно интенсифицирует процесс экстрагирования. В работе [3] было показано на примере извлечения диосцина из семян пажитника сенного, что повышение частоты вращения ротора увеличивает выход БАВ. Однако тонкое измельчение сырья часто приводит к образованию слоя осадка, загрязняющего раствор балластными веществами и затрудняющего его очистку, а также снижает выход БАВ, поэтому изучение этого процесса является необходимым для регулирования дисперсного состава, чтобы обеспечить наибольшую эффективность экстрагирования в аппаратах такого типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Теоретический анализ

В виброкавитационном гомогенизаторе измельчение происходит в результате попадания частиц в зазор между ротором и статором. Учитывая, что величина этого зазора мала, то частицы, попадающие в него, подвергаются механическому воздействию быстро вращающегося ротора и срезаются кромками его отверстий. Таким образом, измельчение частиц в таком аппарате происходит прежде всего за

счет среза частиц в зазоре между ротором и статором. Очевидно, частица под срезающим воздействием ротора разрушается на две, в общем случае, неравные части и сам процесс попадания частиц в зазор и срез носят случайный характер. Существующие модели измельчения частиц, сопровождающего технологические процессы, исходя из стохастических представлений об этом явлении, что позволяет использовать вероятностную теорию марковских процессов [4–9]. Общим недостатком таких моделей можно считать формальный учет кинетики измельчения, который оставляет без внимания физический механизм этого явления. Между тем измельчение является частным случаем большого класса процессов, в которых дисперсный состав твердой фазы непостоянен. В данной работе для математического описания измельчения частиц использована модель, учитывающая кинетические особенности рассматриваемого процесса.

Пусть $\gamma(m, n)$ – вероятность попадания частицы объемом (массой) m в отверстие ротора за единицу времени в объеме аппарата при некоторой частоте вращения ротора n , а εd – вероятность измельчения частицы массой m на два неравных осколка – $(m-s)$ и s при попадании в зазор между ротором и статором аппарата. Тогда рассуждая аналогично [10, 11] можно записать вероятность измельчения частицы, массой (объемом) m в форме:

$$g(m, n; m-s, s) = \gamma(m, n) \varepsilon d(m; m-s, s). \quad (1)$$

При этом все ранее полученные уравнения в работе [4] остаются в силе.

Так как в кавитационном гомогенизаторе происходит интенсивное перемешивание материала, то можем его рассматривать как аппарат периодического действия идеального смешения. В этом случае уравнение, описывающее кинетику измельчения частиц, примет вид:

$$\frac{\partial F(m, t)}{\partial t} + F(m, t) \frac{1}{2} \int_0^m g(t, m, n; m-s, s) ds = \int_m^\infty g(t, s, n; s-m) F(s, t) ds. \quad (2)$$

Здесь первое слагаемое в левой части характеризует изменение функции распределения частиц по массе во времени, второе слагаемое характеризует изменение функции распределения, связанное с измельчением частиц, причем множитель $\frac{1}{2}$ свидетельствует о принятом допущении, что в результате элементарного акта взаимодействия частицы с массой m , попавшей в зазор между ротором и статором аппарата, образуются две частицы с меньшей массой $m-s$ и s . Правая часть характеризует изменение функции распределения частиц по массе, связанное с измельчением крупных частиц, с образованием частиц массой m . При этом $g(t, s, n; s-m)$ представляет со-

бой ядро интегрального преобразования, физический смысл которого в том, что оно характеризует кинетику измельчения частиц.

Обозначив,

$$\frac{1}{2} \int_0^m g(t, m, n; m-s, s) ds = \theta(m, t, n),$$

уравнение (2) можно записать в виде:

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \theta(m, t, n)F = \int_m^\infty g(t, s, n; s-m)F(s, t)ds. \quad (3)$$

Учитывая, что $F(m, t) = N(t)\varphi(m, t)$, где $N(0) = N_0$ – число исходных частиц в аппарате в начальный момент, а $\int_0^\infty \varphi(m, t)dm = 1$.

Из этого уравнения следует

$$\frac{\partial N}{\partial t} - \langle \theta \rangle(m, t, n)N = 0, \quad (4)$$

где $\langle \theta \rangle(m, t, n) = \int_0^\infty \theta(m, t, n)\varphi(m, t)dm$, т. е. $\langle \theta \rangle(m, t, n)$

представляет собой некую среднюю вероятность дробления частиц массой m .

С учетом симметрии

$$g(t, m, n; m-s, s) = g(t, m, n; s, m-s).$$

Если левую и правую части уравнения (1) умножить на mdm и проинтегрировать в пределах от 0 до ∞ , то получим, что

$$\frac{d}{dt}(\bar{m}N) = 0,$$

откуда следует формула:

$$\bar{m}N(t) = \bar{m}_0N_0, \quad (5)$$

выражающая закон сохранения массы вещества.

Из выражений (4) и (5) следует, что

$$\frac{d\xi}{dt} + \langle \theta \rangle(m, t, n)\xi = 0, \quad (6)$$

где $\xi = \frac{N_0}{N} = \frac{\bar{m}}{\bar{m}_0}$ при $t=0$ $\xi = 1$, $\xi(t, n) \leq 1$.

Интегрирование уравнения (6) в соответствующих пределах дает выражение:

$$\xi = e^{-(\theta)\tau}. \quad (7)$$

Выражение (7) позволяет экспериментальным путем по изменению среднего объема (массы) частицы определить величину средней вероятности измельчения частиц $\langle \theta \rangle(m, t, n)$ при $t > 0$.

При переходе от средней массы частицы к ее среднему размеру (диаметру) для оценки дисперсного состава частиц удобно пользоваться формулой:

$$\bar{d} = \bar{d}_0 \sqrt[3]{\xi}. \quad (8)$$

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Экспериментальные исследования процесса измельчения с целью определения функции $\langle \theta \rangle(m, t, n)$ проводили в виброкавитационном гомогенизаторе, схема которого представлена на рисунке 1.

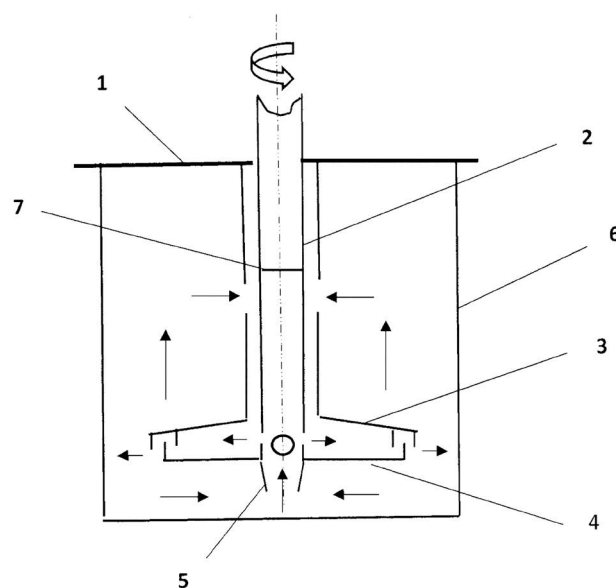


Рисунок 1. Схема виброкавитационного гомогенизатора:

1 – крышка; 2 – втулка; 3 – статор; 4 – ротор; 5 – нижняя втулка; 6 – стакан; 7 – заглушка

Figure 1. Scheme of a vibro-cavitation homogenizer:

1 – cover; 2 – sleeve; 3 – stator; 4 – rotor; 5 – lower sleeve; 6 – glass; 7 – plug

Основными рабочими органами аппарата являются ротор 4 и статор 3. Зазор между ротором и статором составляет всего 0,25 мм. Ротор 3 гранулятора приводится в движение асинхронным электродвигателем, а частота вращения ротора регулировалась с помощью преобразователя частоты. Исходный водный раствор этанола с семенами пажитника сеного загружался в стакан 6, в объеме 0,2 литра, затем ротор аппарата приводился во вращение и выводился на заданную частоту вращения. Опыты проводились при частоте вращения – 1000, 3000 и 5000 об/мин (16,7; 50 и 83,3) 1/с. При каждом значении частоты вращения ротора время процесса варьировалось в диапазоне от 0 до 5 минут, причем процесс вели в течение 60, 120, 180, 240 и 300 секунд.

Исследования проведенные в течение 5 минут и более показали, что дисперсный состав шрота практически не изменяется во времени, но существенно зависит от частоты вращения ротора. Таким образом, после 5 минут наступает некая стабилизация дисперсного состава и дальнейшее пребывание материала в аппарате не приводит к заметному изменению дисперсного состава. После каждого опыта шрот отбирали, высушивали и проводили ситовой анализ дисперсного состава.

В качестве материала использовали семена пажитника сенного, из которых экстрагировали диосцин. Кинетику измельчения изучали по изменению дисперсного состава частиц в периодическом процессе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерные кривые изменения во времени относительной массы частиц – $\xi(t, n)$ в периодическом процессе измельчения при различных значениях частоты вращения ротора представлены на рисунке 2.

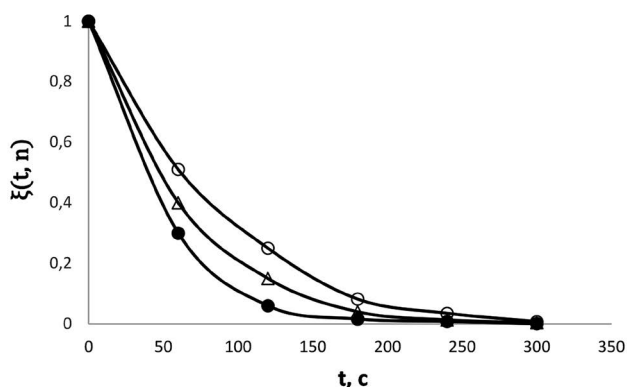


Рисунок 2. Зависимость относительной массы частиц от времени при различной частоте вращения ротора:

○ – $n = 16,7$ 1/с; Δ – $n = 50$ 1/с; ● – $n = 83,3$ 1/с

Figure 2. Dependence of the relative mass of particles on time at different rotor speed:

○ – $n = 16.7$ 1/s; Δ – $n = 50$ 1/s; ● – $n = 83.3$ 1/s

Сравнительный анализ кривых изменения относительной массы частиц во времени показал, что наиболее интенсивное измельчение протекает на первых 60–120 секундах, при этом относительная масса частиц уменьшается в два и более раз, затем процесс замедляется и в последующее время изменение массы становится незначительным.

По результатам, полученным при обработке экспериментальных данных по уравнению (6), были рассчитаны значения средней вероятности и, как оказалось, $\langle \theta \rangle(t, n)$ практически не зависит от времени, а зависит только от частоты вращения ротора, т. е. $\langle \theta \rangle(t, n) \approx \langle \theta \rangle(n)$. Была получена зависимость изменения $\langle \theta \rangle(n)$ при различной частоте вращения ротора n . Такая зависимость представлена на рисунке 3.

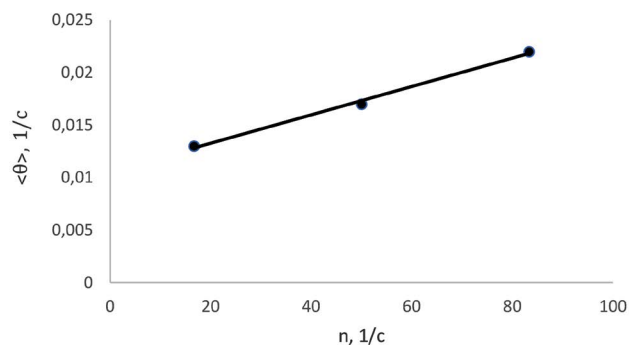


Рисунок 3. Зависимость $\langle \theta \rangle(n)$ от частоты вращения ротора

Figure 3. Dependence of $\langle \theta \rangle(n)$ on the rotor speed

Анализ этих результатов показал, что величина средней вероятности измельчения частиц в кавитационном гомогенизаторе увеличивается с повышением частоты вращения ротора, что вполне ожидаемо, так как возрастает частота контактов частиц с рабочими органами аппарата.

Кроме того, полученная зависимость для средней вероятности измельчения частиц имеет линейный характер, и хорошо аппроксимируется выражением вида:

$$\langle \theta \rangle(n) = 0,0001n + 0,0106, \quad (9)$$

здесь $n - \frac{1}{c}$ и тогда получаем выражение для определения $\xi(t, n)$:

$$\xi(t, n) = \exp - (0,0001n + 0,0106)t. \quad (10)$$

Выражение (10) достаточно точно описывает значения ξ в рабочем диапазоне $n = 16,7 - 83,3$ 1/с.

С учетом этих значений экспериментальные результаты по определению $\xi(t, n)$ и расчетные по выражению (10) имеют хорошее совпадение (рисунок 4).

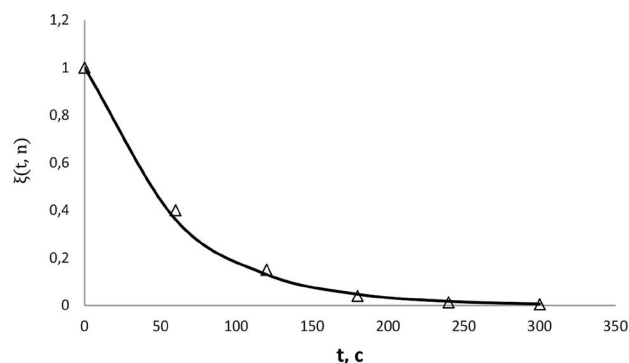


Рисунок 4. Сравнение расчетных и экспериментальных значений относительной массы частиц от времени при частоте вращения ротора $n = 50$ 1/с. Линия – расчет, точки Δ – эксперимент

Figure 4. Comparison of the calculated and experimental values of the relative mass of particles from time to time at a rotor speed $n = 50$ 1/s. Line – calculation, points Δ – experiment

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, зная n и t , с помощью выражения (10) можно расчетным путем определить $\xi(t, n)$ и, следовательно, среднюю массу частиц, полученных в результате измельчения при взаимодействии частиц с вращающимся ротором, и оценить степень измельчения материала в аппаратах такого типа.

Кроме того, предложенный подход и полученные результаты могут быть использованы для оценки дисперсного состава частиц, получаемых и в других конструкциях аппаратов подобного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белокуров С. С., Флисюк Е. В., Наркевич И. А., Лужанин В. Г., Шилов С. В., Новикова К. О. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сеного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):47–53.
2. Пименов Ю. А. Виброкавитационный смеситель-гомогенизатор. Патент РФ № 2131761. Пер. № 98105553/25. Заявл. 25.03.1998. Опубл. 20.06.1999.
3. Флисюк Е. В., Белокуров С. С., Наркевич И. А., Шиков А. Н., Флисюк О. М., Ивкин Д. Ю. Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):77–81.
4. Chakraborty J., Ramkrishna D. Identification of Markov Matrices of Milling Models. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009;48:9763–9771. DOI: 10.1021/ie900456j.
5. Berthiaux H., Mizonov V., Zhukov V. Application of the theory of Markov chains to model different processes in particle technology. *Powder Technology*. 2005;157:128–137. DOI: 10.1016/j.powtec.2005.05.019.
6. Berthiaux H. Analysis of grinding processes by Markov chains. *Powder Technology*. 2014;253:385–392. DOI: 10.1016/S0009-2509(00)00086-5.
7. Межеумов Г. Г., Жуков В. П., Мизонов В. Е. Применение теории цепей Маркова к моделированию замкнутого цикла измельчения. *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология*. 2005;48(4):135–137.
8. Мизонов В. Е., Федосов С. В., Смирнов С. Ф., Красильников А. Г. Применение теории цепей Маркова к моделированию кинетики измельчения в трубных мельницах замкнутого цикла. *Строительные материалы*. 2007;10:41–45.
9. Mitrofanov A., Mizonov V., Tannous K., Ovchinnikov L. A. Markov chain model to describe fluidization of particles with time-varying properties. *Particulate Science and Technology*. 2018;36(2):244–253. DOI: 10.1080/02726351.2016.1243180.
10. Пеньков Н. В., Флисюк О. М. Математическая модель процессов дробления частиц в аппаратах периодического и непрерывного действия. *Журнал прикладной химии*. 1985;58(5):1161.
11. Флисюк О. М., Фролов В. Ф., Саргаева Ю. В. Теоретическое и экспериментальное исследование процесса дробления в скоростном грануляторе. *Теоретические основы химической технологии*. 2010;44(6):712–714.

REFERENCES

1. Belokurov S. S., Flisyuk E. V., Narkevich I. A., Lujanin V. G., Shilov S. V., Novikova K. O. Comparative analysis of promising extraction methods for obtaining extracts from hay fenugreek seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):47–53. (In Russ.).
2. Pimenov Yu. A. Vibro-cavitation mixer-homogenizer. Patent Rus. Federation No. 2131761; reg. No. 98105553.25. Declared 03.25.1998/ Publ. 06.20.1999. (In Russ.).

3. Flisyuk E. V., Belokurov S. S., Narkevich I. A., Shikov A. N., Flisyuk O. M., Ivkin D. Yu. Kinetics of Dioscin extraction from plant raw materials in a vibro-cavitation homogenizer. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):77–81. (In Russ.).
4. Chakraborty J., Ramkrishna D. Identification of Markov Matrices of Milling Models. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009;48:9763–9771. DOI: 10.1021/ie900456j.
5. Berthiaux H., Mizonov V., Zhukov V. Application of the theory of Markov chains to model different processes in particle technology. *Powder Technology*. 2005;157:128–137. DOI: 10.1016/j.powtec.2005.05.019.
6. Berthiaux H. Analysis of grinding processes by Markov chains. *Powder Technology*. 2014;253:385–392. DOI: 10.1016/S0009-2509(00)00086-5.
7. Mezheumov G. G., Zhukov V. P., Mizonov V. E. Application of the theory of Markov chains to modeling a closed grinding cycle. *Izvestiya vysshih uchebnykh zavedenii, seriya khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = «Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya» Russian Journal of Chemistry and Chemical Technology*. 2005;48(4):135–137. (In Russ.).
8. Mizonov V. E., Fedosov C. B., Smirnov S. F., Krasilnikov A. G. Application of the theory of Markov chains to modeling the kinetics of grinding in closed-cycle tube mills. *Stroitel'nye Materialy = Construction Materials*. 2007;10:41–45. (In Russ.).
9. Mitrofanov A., Mizonov V., Tannous K., Ovchinnikov L. A. Markov chain model to describe fluidization of particles with time-varying properties. *Particulate Science and Technology*. 2018;36(2):244–253. DOI: 10.1080/02726351.2016.1243180.
10. Penkov N. V., Flisyuk O. M. Mathematical model of particle crushing processes in devices of periodic and continuous action. *Zhurnal prikladnoy himii = Journal of Applied Chemistry*. 1985;58(5):1161. (In Russ.).
11. Flisyuk O. M., Frolov V. F., Sargaeva Yu. V. Theoretical and Experimental Study of Crushing in a High-Speed Granulator. *Teoreticheskie osnovy himicheskoy tekhnologii*. 2010;44(6):712–714. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-59-64>
UDC 615.014



Research article/Оригинальная статья

New Approach to Drug Delivery in Ophthalmological Practice: Development of Composite Ophthalmological Solution for Drug Loading of Soft Contact Lenses

Denis K. Naplekov¹, Elena T. Zhilyakova¹, Anastasiya Yu. Malyutina^{1*}, Aleksander V. Bondarev¹,
Natalia B. Demina², Oleg O. Novikov³, Rimma A. Abramovich³

1 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State University», 85, Pobedy str., Belgorod, 308015, Russia
2 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
3 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*Corresponding author: Anastasiya Yu. Malyutina. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

ORCID: Denis K. Naplekov – <https://orcid.org/0000-0003-3753-4922>; Elena T. Zhilyakova – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>;

Anastasiya Yu. Malyutina – <https://orcid.org/0000-0001-6170-2151>; Aleksander V. Bondarev – <https://orcid.org/0000-0002-5250-0731>;

Natalia B. Demina – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; Oleg O. Novikov – <https://orcid.org/0000-0002-7038-9803>; Rimma A. Abramovich – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Received: 02.07.2020. Revised: 19.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. This article provides a tentative justification of use of soft contact lenses as a carrier of ophthalmological solutions to eye tissues.

Aim. The aim of the research is to develop the composition of the ophthalmic transport system for the treatment of glaucoma. Also, the proposed manufacturing algorithms were proposed for drug loading ophthalmological solutions.

Materials and methods. Preparation of sodium hyaluronate solution was carried out based on the methodology described in EP 7.0 [01/2011:1472] (Sodium hyaluronate).

Results and discussion. The conducted investigation with the purpose to justify a concentration of sodium hyaluronate helped to determine its concentration that gives the viscosity level as close to the upper limit stated in Russian Pharmacopoeia as possible. Buffer solution was chosen with criteria to use as less components in ophthalmological solution as possible. Also, it was found out that the more components are added to the viscous solution, the more viscosity level is decreased. Thus, initial viscosity of solution containing sodium hyaluronate was 149.59 mm²/s, and after addition of active pharmaceutical substance it dropped down to 88.49 mm²/s and 81.36 mm²/s for model solution number 1 and 2, respectively. After addition of citric acid and disodium hydrophosphate, the viscosity of model solution was found to be 78.11 mm²/s and 75.28 mm²/s for model solution number 1 and 2, respectively.

Conclusion. As a result of the studies, two alternative model compositions of an ophthalmic solution for the saturation of soft contact lenses for the treatment of glaucoma were proposed. The choice of active pharmaceutical substances, and excipients has been justified. Technological procedure of preparation of model solution was described and explained, where the most attention was paid on dissolving of sodium hyaluronate in purified water.

Keywords: soft contact lenses, mucoadhesive polymers, drug delivery, pharmaceutical technology.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena T. Zhilyakova and Denis K. Naplekov developed the approach to study the properties of soft contact lenses as the drug carriers. The proposed experimental strategy was approved by Elena T. Zhilyakova, Oleg O. Novikov, Natalia B. Demina and Rimma A. Abramovich. The measurements of viscosity of sodium hyaluronate solution were conducted by Denis K. Naplekov. Selection of active ingredients and excipient substances of the solution for drug loading of soft contact lenses was done by Aleksander V. Bondarev and Denis K. Naplekov. Quantitative assessment of intake and release processes of soft contact lenses was conducted by Denis K. Naplekov, Anastasiya Yu. Malyutina and Aleksander V. Bondarev via gravimetric and UV-spectrophotometry methods. Data processing and review of the results were done by Oleg O. Novikov, Anastasiya Yu. Malyutina and Elena T. Zhilyakova. The conclusion on the acquired experimental results were approved by Elena T. Zhilyakova, Oleg O. Novikov, Natalia B. Demina and Rimma A. Abramovich. All authors equally contributed to writing the current manuscript and approval of its text.

For citation: Naplekov D. K., Zhilyakova E. T., Malyutina A. Yu., Bondarev A. V., Demina N. B., Novikov O. O., Abramovich R. A. New approach to drug delivery in ophthalmological practice: development of composite ophthalmological solution for drug loading of soft contact lenses. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-59-64>

Новый подход к доставке лекарственных средств в офтальмологической практике: разработка композитного офтальмологического раствора для лекарственной нагрузки мягких контактных линз

Д. К. Наплеков¹, Е. Т. Жиликова¹, А. Ю. Малинина^{1*}, А. В. Бондарев¹, Н. Б. Демина²,
О. О. Новиков³, Р. А. Абрамович³

1 – ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

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

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

*Контактное лицо: Малинина Анастасия Юрьевна. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru

© Naplekov D. K., Zhilyakova E. T., Malyutina A. Yu., Bondarev A. V., Demina N. B., Novikov O. O., Abramovich R. A., 2020

© Наплеков Д. К., Жиликова Е. Т., Малинина А. Ю., Бондарев А. В., Демина Н. Б., Новиков О. О., Абрамович Р. А., 2020

ORCID: Д. К. Наплеков – <https://orcid.org/0000-0003-3753-4922>; Е. Т. Жияякова – <https://orcid.org/0000-0002-8685-1601>; А. Ю. Малютина – <https://orcid.org/0000-0001-6170-2151>; А. В. Бондарев – <https://orcid.org/0000-0002-5250-0731>; Н. Б. Демина – <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>; О. О. Новиков – <https://orcid.org/0000-0002-7038-9803>; Р. А. Абрамович – <https://orcid.org/0000-0003-1784-881X>.

Статья поступила: 02.07.2020. Статья принята в печать: 19.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В статье представлены данные по предварительному обоснованию применения мягких контактных линз в качестве носителя офтальмологических растворов и их доставки к тканям глаза.

Цель. Цель исследования – разработка состава офтальмологической транспортной системы для лечения глаукомы. Также предложены алгоритмы изготовления лекарственных препаратов для загрузки офтальмологических растворов.

Материалы и методы. Приготовление раствора гиалуроната натрия. проводили по методике, описанной в Европейской Фармакопее 7.0 [01/2011: 1472] (гиалуронат натрия).

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование с целью обоснования концентрации гиалуроната натрия позволило определить его концентрацию, дающую уровень вязкости максимально приближенный к верхнему пределу, установленному в Российской фармакопее. Буферный раствор был выбран с учетом критериев использования как можно меньшего количества компонентов в офтальмологическом растворе. Также установлено, что чем больше компонентов добавляется в вязкий раствор, тем больше снижается уровень вязкости. Таким образом, начальная вязкость раствора, содержащего гиалуронат натрия, составила 149,59 мм²/с, а после добавления активного фармацевтического вещества она снизилась до 88,49 мм²/с и 81,36 мм²/с для модельного раствора № 1 и 2 соответственно. После добавления лимонной кислоты и диэтилового гидрофосфата вязкость модельного раствора составила 78,11 мм²/с и 75,28 мм²/с для модельного раствора № 1 и 2 соответственно.

Заключение. В результате проведенных исследований были предложены две альтернативные модельные композиции офтальмологического раствора для насыщения мягких контактных линз для лечения глаукомы. Обоснован выбор активных фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ. Описана и объяснена технологическая процедура приготовления модельного раствора, где наибольшее внимание уделялось растворению гиалуроната натрия в очищенной воде.

Ключевые слова: мягкие контактные линзы, мукоадгезивные полимеры, доставка лекарственных средств, фармацевтическая технология.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. Т. Жияякова и Д. К. Наплеков разработали подход к изучению свойств мягких контактных линз как носителей лекарственных веществ. Согласование предложенной стратегии эксперимента было осуществлено Е. Т. Жияяковой, О. О. Новиковым, Н. Б. Деминой и Р. А. Абрамович. Измерение вязкости раствора натрия гиалуроната было осуществлено Д. К. Наплековым. Подбор активных и вспомогательных компонентов раствора для насыщения мягких контактных линз был выполнен А. В. Бондаревым и Д. К. Наплековым. Количественная оценка процессов насыщения и высвобождения мягких контактных линз гравиметрическим и УФ-спектрофотометрическим методами была проведена Д. К. Наплековым, А. Ю. Малютиной и А. В. Бондаревым. Обработку и обзор полученных результатов осуществляли О. О. Новиков, А. Ю. Малютина и Е. Т. Жияякова. Заключение о результатах эксперимента было согласовано с Е. Т. Жияяковой, О. О. Новиковым, Н. Б. Деминой и Р. А. Абрамович. Все авторы в одинаковой степени участвовали в написании и согласовании текста статьи.

Для цитирования: Наплеков Д. К., Жияякова Е. Т., Малютина А. Ю., Бондарев А. В., Демина Н. Б., Новиков О. О., Абрамович Р. А. Новый подход к доставке лекарственных средств в офтальмологической практике: разработка композитного офтальмологического раствора для лекарственной нагрузки мягких контактных линз. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-59-64>

INTRODUCTION

Since the first mention of soft contact lenses (SCL) in the context of prolonged delivery of active pharmaceutical substances (API) to the eye tissues, a number of methods have been developed to date that allow saturating the lens with pharmacologically active agents. Among the very first and simplest methods for saturating SCL, one can distinguish such as soaking SCL in an ophthalmic solution immediately or several hours before use, instilling eye drops (ED) on the surface of contact lenses already worn on the eyes [1]. Currently known methods of achieving a prolonged effect utilizing SCL, have not proved their significant advantage over the use of ED. This is primarily due to the fact that SCL are different in structure, the features of which determine the volume of a contact lens reservoir capable of absorbing drug molecules [2]. However, along with the drawbacks of modern methods of saturating contact lenses, there is also an advantage – the ability for the patient to independently prepare their SCL for the drug delivery process. In this regard, the method of soaking contact lenses in an oph-

thalmic solution does not lose its relevance, and the search for new approaches to its improvement is a promising direction in the development of ophthalmic therapeutic systems [3].

It is presumably possible to explain the low efficiency of SCL drug loading by soaking, root cause of which is a low viscosity of the ophthalmic solution, which probably leads to excessively fast leaching of the drug substance from the lens surface into the external environment. At earlier stages of this research work, it was found that prolonged saturation of SCL with an ophthalmic solution leads to irreversible binding of drug molecules to the surface of the carrier. The solution to this problem can be an increase in the viscosity of the ophthalmic solution for saturation by introducing mucoadhesive substances into the composition, which, by increasing the viscosity, can also increase the residence time of drugs on the surface of the SCL [4]. Currently, a wide range of mucoadhesive substances is known, which by their nature are hydrophilic polymers and are used in the manufacture of preparations of the «artificial tear» group. Such substances include synthetic derivatives of cellulose: methyl cellulose,

hydroxypropyl methyl cellulose, sodium salt of carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, etc. In addition, other hydrophilic polymers are known that are used as ophthalmic dosage form prolongers, among which carbomer, polyvinyl alcohol, sodium hyaluronate [5].

For the development of ophthalmic therapeutic systems based on SCL, it is desirable that, in addition to mucoadhesive properties, the hydrophilic polymer also has pronounced lubricating properties. According to literature data, such requirements are met by sodium hyaluronate [6].

Thus, by introducing mucoadhesive substances into the composition of the ophthalmic solution to saturate the SCL, the saturation of the lenses is expected not primarily as a result of intermolecular interaction of the polymer surface and the drug, but as a result of adhesion (adhesion) of a viscous ophthalmic solution with the lens surface [7]. Upon completion of the saturation process, by the time of use, the patient will receive contact lenses uniformly coated with a thin drug layer [8].

In addition to simple methods of using SCL as a means of drug delivery, there is an extensive group of high-tech methods for introducing drug molecules directly into SCL itself, usually at the stage of polymerization of its material: introducing colloidal particles (liposomes, nano/microemulsions, nanosuspensions) [9]; the inclusion of ligands in hydrogels; inclusion of the drug itself (molecular imprinting) in the polymer's SCL structure [10]. A common drawback of modern methods of introducing into the lens of the drug is the lack of the ability for the patient to independently perform this operation. Among other negative aspects of high-tech methods for saturating SCL, labor intensity, time consuming and, as a result, the high cost of the final product are separately singled out [11].

Speaking about the development of the composition and technology of the ophthalmic therapeutic system, it is the ophthalmic solution that is meant to saturate SCL as the most critical component of the system. It is assumed that the patient fills the SCL container with the drug solution and places the SCL there for a certain period. For some time, due to the high viscosity, the solution of active substances binds to the surface of the SCL, which is then removed from the container and placed on the affected eye for wear during the day. Thus, the release of a viscous solution from the surface of the SCL and its distribution over the surface of the eye is initiated, from which the start of the absorption process and the emergence of a therapeutic effect are expected.

The purpose of this fragment of a large-scale study was to develop the composition of an ophthalmic solution for saturation of SCL.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of sodium hyaluronate solution. The preparation of solutions was carried out based on the methodology described in EP 7.0 [01/2011:1472] (Sodium hyaluronate). Accurate samples of the substance were

weighed on an electronic balance with an accuracy of 0.001 g in accordance with the planned concentration of the solution, 25 mL of water for injection was measured in each heat-resistant chemical beaker. Chemical glasses with water for injection were placed on the heating platform of a heated magnetic stirrer and the heating function was turned on. When the temperature of the water for injection reached 50 °C, the heating function was turned off and stirring was turned on at low speed. Weighed portions of hyaluronic acid, corresponding to a certain concentration of the solution, were gradually introduced in small portions into a beaker. After the hyaluronic acid was added, stirring was continued for 30 min. Next, the beakers with solutions were removed from the heating element of the magnetic stirrer, their contents were transferred to volumetric flasks, rinsing the bottom of the beaker with water for injection to avoid loss of hyaluronic acid concentration, after which the solution volume was adjusted to 100 mL with water for injection. The solution was considered correctly prepared if gel particles were not visually detected in the transmitted light in the solution [12, 13].

The calculation of the osmolarity of the studied solutions was carried out according to the formula 1.

$$C_{osm} = \sum \frac{m_i \cdot n_i \cdot 100}{M_i},$$

where C_{osm} – osmolarity of solution, mOsm/L; m_i – substance content in solution, g/L; n_i – total number of ions formed from a single molecule of a solute as a result of dissociation; M_i – molar mass of the substance, g/mol.

RESULTS AND DISCUSSION

A study was conducted of model solutions of sodium hyaluronate of various concentrations in order to select the optimal viscosity of the solution to saturate SCL as part of an ophthalmic therapeutic system.

In General Pharmacopoeia Monograph 1.4.1.0003.15 «Ophthalmic dosage forms» the recommended viscosity for eye drops is from 5 to 15 mm²/s. However, if it is necessary to ensure higher mucoadhesiveness of the ophthalmic solution, a viscosity of up to 150 mm²/s is justified. The higher the value of the viscosity of the solution for drug loading, the greater the specific work required for its separation with the surface of the SCL. And this is important to ensure the prolonged action of the drug.

Based on the data presented above, it is rational to choose a hydrophilic polymer to increase the viscosity of an ophthalmic sodium hyaluronate solution. In addition, it is one of the most popular substances used in the manufacture of artificial tear preparations [14–16]. Therefore, the ophthalmological therapeutic system acquires an additional positive property to wetting the surface of the eye and, accordingly, reducing the likelihood of developing adverse events associated with wearing SCL. In this regard, model solutions of sodium hyaluronate were prepared in concentrations from 0.05 % to 1.00 % in increments of 0.05 %.

Figure 1 shows the dynamics of changes in the viscosity of the solution with increasing concentration of sodium hyaluronate.

As can be seen from the data presented in figure 1, with an increase in the concentration of sodium hyaluronate, an increase in the viscosity of its solution was also observed. In order to meet the requirements of general pharmacopeia monograph ОФС.1.4.1.0003.15 and at the same time ensure the maximum possible degree of binding of the ophthalmic solution to the surface of the SCL, a 0.5 % sodium hyaluronate solution with a viscosity value of 149.59 mm²/s was chosen.

The following drug combinations in recommended doses were proposed as active substances in an ophthalmic solution for saturating SCL: brimonidine tartrate + pyridoxine hydrochloride and betacolol hydrochloride + pyridoxine hydrochloride. The use of both compositions suggests a decrease in intraocular pressure and a simultaneous regeneration of eye tissues.

The physicochemical properties of model solutions containing the active components were measured, including with the aim of choosing the amount of buffer. The results are presented in table 1.

As follows from the data presented in table 1, the viscosity of model solutions with active components is less than in placebo solutions of sodium hyaluronate. It amounted to 88.49 mm²/s and 81.36 mm²/s for model solution 1 and 2, respectively. Based on the obtained pH data, both model solutions are acidic mixtures with close pH values. In this regard, it was rational to introduce a buffer solution into the composition in order to maintain a pH level that is comfortable for the eye tissues. Considering the purpose and availability of the components, a phosphate buffer having the following composition was selected for the composition of the ophthalmic solution being developed: 82.4 mL of disodium hydrophos-

phate solution (71.5 g/L) and 17.6 mL of citric acid solution (21 g/L). It was experimentally found that in order to achieve acceptable human eye pH values of model solutions with a volume of 100 ml, 0.0085 g of citric acid and 0.0290 g of disodium hydrogen phosphate are required.

Table 1. Compositions and physicochemical parameters of model solutions

Таблица 1. Составы и физико-химические параметры модельных растворов

Composition of model solution		Physicochemical parameters	
		Viscosity, мм ² /с	pH
<i>Model solution 1</i>		88.49	4.17
Brimonidine tartrate	0.006 g		
Pyridoxine hydrochloride	0.009 g		
Sodium hyaluronate	0.015 g		
Water purified for injections	up to 3 mL		
<i>Model solution 2</i>		81.36	4.82
Betaxolol hydrochloride	0.017 g		
Pyridoxine hydrochloride	0.009 g		
Sodium hyaluronate	0.015 g		
Water purified for injections	up to 3 mL		

In its turn, the theoretical osmolarity of the developed compounds was calculated, taking into account the requirements of the general pharmacopeia monograph ОФС.1.2.1.0003.15 «Osmolarity», where solutions meeting the osmolarity range of 239–376 mOsm/L are considered isotonic.

The results of calculating the theoretical osmolarity of the proposed solutions are presented in table 2.

From table 2 it follows that all formulations meet the recommended requirements for osmolarity, and the osmolarity of model solutions 1 and 2 varies slightly, is 304.03 and 366.42 mOsm/L, respectively. The gra-

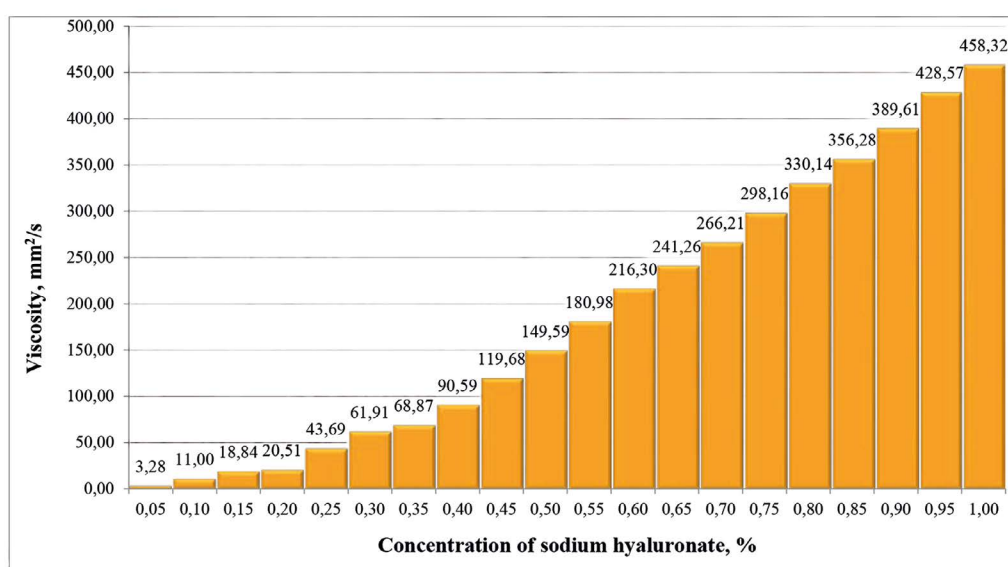


Figure 1. The dynamics of the viscosity of solutions with increasing concentration of sodium hyaluronate

Рисунок 1. Динамика вязкости растворов с увеличением концентрации гиалуроната натрия

test influence on the osmolarity of the proposed model solutions is exerted by one of the components of the phosphate buffer, disodium hydrophosphate, whose osmolarity is 272.46 mOsm/L.

Based on the theoretically calculated osmolarity values for all the proposed model solutions, the introduction of an additional amount of sodium chloride for the purpose of isotonization was not required.

Table 2. Theoretical osmolarity values of model solutions

Таблица 2. Теоретические значения осмолярности модельных растворов

No	Component	Model solution	
		№ 1	№ 2
		Osmolarity, mOsm/L	
1	Brimonidine tartrate	12.17	–
2	Betaxolol hydrochloride	–	32.57
3	Pyridoxine hydrochloride	29.17	29.17
4	Citric acid	29.56	29.56
5	Disodium hydrophosphate	272.46	272.46
6	Sodium hyaluronate	0.67	0.67
7	Summarized osmolarity, mOsm/L	344.03	364.42

Table 3 presents the results of a study of the physico-chemical properties of the proposed solutions.

Table 3. Physico-chemical properties of model solutions

Таблица 3. Физико-химические свойства модельных растворов

Parameter	Model solution	
	№ 1	№ 2
Transparency and turbidity	Transparent	Transparent
Color	Colorless liquid	Colorless liquid
pH	7.34	7.47
Viscosity, mm ² /s	78.11	75.28
Theoretical osmolarity, mOsm/L	344.03	364.42

From the data given in table 3, it follows that both model solutions according to physicochemical parameters meet the requirements of General Pharmacopoeia Article 1.4.1.0003.15 «Ophthalmic dosage forms». Thus, the compositions of the proposed model ophthalmic solutions are presented with the results of calculations of API and excipients in table 4.

In laboratory conditions, model solutions were prepared as follows.

Phosphate buffer solution: 50 mL of water for injection was measured into a 100 ml beaker and the mixture was heated. Upon reaching a temperature of 30 °C with constant stirring, the components of the borate buffer were added in the following sequence: citric acid – 0.284 g, disodium hydrophosphate – 0.967 g. The next component was added after complete dissolution of the previous one.

Simultaneously, in another 100 mL beaker, a 30 mL sodium hyaluronate solution was prepared according to the procedure described above.

Table 4. The proposed compositions of the ophthalmic solutions for drug loading of SCL

Таблица 4. Предлагаемые композиции офтальмологических растворов для лекарственной нагрузки мягких контактных линз

Composition per 100 mL	
<i>Model solution 1</i>	
Brimonidine tartrate	0.2 g
Pyridoxine hydrochloride	0.3 g
Citric acid	0.284 g
Disodium hydrophosphate	0.967 g
Sodium hyaluronate	0.5 g
Water purified for injections	up to 100 mL
<i>Model solution 2</i>	
Betaxolol hydrochloride	0.56 g
Pyridoxine hydrochloride	0.3 g
Citric acid	0.284 g
Disodium hydrophosphate	0.967 g
Sodium hyaluronate	0.5 g
Water purified for injections	up to 100 mL

In 50 mL of a solution of phosphate buffer with constant stirring, the amounts of APIs presented in table 4 were added. The mixture was stirred until complete dissolution of the active substances, after which stirring was continued for 30 minutes.

To 30 mL of sodium hyaluronate solution was added 50 mL of a solution containing phosphate buffer, brimonidine tartrate and pyridoxine hydrochloride, after which stirring was carried out for another 10 minutes. The resulting solution from the beaker was transferred to a 100 mL volumetric flask, the volume was adjusted to the mark with water for injection, rinsing the bottom and walls of the beaker with the aim of transferring the full volume of the components included in the solution. The transparency of the solution, the absence of visible gel particles, pH, and viscosity were controlled.

CONCLUSIONS

As a result of the studies, two alternative model compositions of an ophthalmic solution for the saturation of SCL for the treatment of glaucoma were proposed. These developments are planned for further use in the process of creating an ophthalmic transport system. The choice of active pharmaceutical substances, and excipients has been justified. Technological procedure of preparation of model solution was described and explained, where the most attention was paid on dissolving of sodium hyaluronate in purified water. The conducted investigation with the purpose to justify a concentration of sodium hyaluronate helped to determine its concentration that gives the viscosity level as close to the upper limit stated in Russian Pharmacopoeia as possible. Buffer solution was chosen with criteria to use as less components in ophthalmological solution as possible. Also, it was found out that the more components are added to the viscous solution, the more viscosity level is decreased. Thus, initial viscosity of solution containing sodium hyaluronate

was 149.59 mm²/s, and after addition of active pharmaceutical substance it dropped down to 88.49 mm²/s and 81.36 mm²/s for model solution number 1 and 2, respectively. After addition of citric acid and disodium hydrophosphate, the viscosity of model solution was found to be 78.11 mm²/s and 75.28 mm²/s for model solution number 1 and 2, respectively. All studies were conducted in accordance with the regulations of State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIV edition.

The results were obtained under state grant No. 12.6429.2017/BCh «Complex research of plant-origin objects in the process of creating targeted dosage forms for proctology».

REFERENCES

1. Mei Y., Yangfan Y., Ming L., Chengtian Y., Chunshun Zh., Jiangang X., Kaili W., Minbin Y. Experimental studies on soft contact lenses for controlled ocular delivery of pirfenidone: in vitro and in vivo. *Drug Delivery*. 2016;23(9):3538–3543.
2. Hegde R. R., Verma A., Ghosh A. Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery. *ISRN Pharm*. 2013;1:82–98.
3. Maulvi F. A., Lakdawala D. H., Shaikh A. A., Desai A. R., Choksi H. H., Vaidya R. J., Ranch K. M., Koli A. R., Vyas B. A., Shah D. O. In vitro and in vivo evaluation of novel implantation technology in hydrogel contact lenses for controlled drug delivery. *J. Control. Release*. 2016;226:47–56.
4. Verma M. S., Liu S., Chen Y. Y., Meerasa A., Gu F. X. Size-tunable nanoparticles composed of dextran-b-poly(D,L-lactide) for drug delivery applications. *Nano Res*. 2012;5:49–61.
5. Liechty W. B., Kryscio D. R., Slaughter B. V., Peppas N. A. Polymers for drug delivery systems. *Annu. Rev. Chem. Bio-mol. Eng.* 2010;1:149–173.
6. Weeks A., Subbaraman L. N., Jones L., Sheardown H. The competing effects of hyaluronic and methacrylic acid in model contact lenses. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2012;23:1021–1038.
7. Paz E., Narbon J., Abenojar J., Del Real J. C., Cledera-Castro M. M. Influence of Acrylic Adhesive Viscosity and Surface Roughness on the Properties of Adhesive Joint. *The Journal of Adhesion*. 2015;92(11):877–891.
8. Knopf-Marques H., Pravda M., Wolfova L., Velebny V., Schaaf P., Vrana N. E., Lavalle P. Hyaluronic acid and its derivatives in coating and delivery systems: Applications in tissue engineering, regenerative medicine and immunomodulation. *Adv. Healthc. Mater.* 2016;5:2841–2855.
9. Hiratani H., Fujiwara A., Tamiya Y., Mizutani Y., Alvarez-Lorenzo C. Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses. *Biomater*. 2005;26:1293–1298.
10. Zhang V. V., Akhter K. F. Encapsulation and releasing of protein drugs through nano structured contact lens. *ARVO*. 2010;51(13):439.
11. Kim H. J., Zhang K., Moore L., Ho D. Diamond nanogel-embedded contact lenses mediate lysozyme-dependent therapeutic release. *ACS Nano*. 2014;8:2998–3005.
12. Bykovskiy S. N., Vasilenko I. A., Harchenko M. I. Handbook of instrumental research methods in the development and examination of the quality of drugs. Moscow: Pero. 2014. 656 p. (In Russ.).
13. Haywood A., Glass B. D. Pharmaceutical excipients – where do we begin? *Australian Prescriber*. 2011;34(4):112–114.
14. Zhilyakova E. T., Timoshenko E. Yu. Development of the composition and technology of eye drops based on miramistin. *Vestn. new medical technologies*. 2007;4(14):143–148.
15. Zhilyakova E. T., Novikov O. O., Novikova M. Yu., Popov N. N. The development of composition and technology of innovational combined medicinal preparation for treatment of infectious conjunctivitis bacterial etiology. *Scientific sheets of BelSU. Medicine and Pharmacy*. 2012;10(129):123–126. (In Russ.).
16. Alexeev K. V., Gritskova I. A., Kedik S. A. Polymers for pharmaceutical technology. Moscow: IFT. 2011. 512 p. (In Russ.).

Всероссийская олимпиада студентов «Я – профессионал»

В 2020–2021 учебном году в четвертый раз проводится олимпиада «Я – профессионал» – один из самых масштабных студенческих конкурсов в стране. К участию в олимпиаде приглашаются учащиеся бакалавриата, магистратуры и специалитета. Попробовать свои силы можно в одном или нескольких из 72 конкурсных направлений. Среди них четыре медицинских дисциплины:

- Лечебное дело и педиатрия.
- Медико-профилактическое дело.
- Стоматология.
- Фармация.

Эти направления организует Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова. Дипломанты олимпиады смогут получить льготы при поступлении в магистратуры, аспирантуры и ординатуры ведущих российских вузов и пройти профильную стажировку. Для сильнейших участников состязаний – медалистов – предусмотрены также денежные премии до 300 тысяч рублей.



Регистрация участников продлится до 24 ноября на официальном сайте олимпиады «Я – профессионал»: <https://yandex.ru/profi>. А уже 27 ноября начнется отборочный онлайн-этап. Предлагаем студентам зарегистрироваться, получить важный опыт и побороться за полезные призы.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-66-71>
УДК 615.01; 616-092.4



Оригинальная статья/Research article

Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы

О. Е. Клементьева¹, А. Б. Брускин^{1*}, К. А. Лунёва¹, В. Б. Бубенчиков¹, К. Э. Терновская¹,
А. С. Лунёв¹, Г. Е. Кодина¹

1 – ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

*Контактное лицо: Брускин Александр Борисович. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: О. Е. Клементьева – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; А. Б. Брускин – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>; К. А. Лунёва – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>;
В. Б. Бубенчиков – <https://orcid.org/0000-0002-2348-4269>; К. Э. Терновская – <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>; А. С. Лунёв – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>;
Г. Е. Кодина – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Статья поступила: 21.07.2020. Статья принята в печать: 19.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В 2018 году в России меланома вышла на одну из лидирующих позиций по числу больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования. Данная форма рака кожи обладает высокой степенью злокачественности и стремительным прогрессированием, что приводит к самым тяжелым последствиям. Применение методов ядерной медицины необходимо на стадиях уточнения диагноза, поиска удаленных метастазов и контроля хода лечения. Работа посвящена одному из этапов разработки радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) для диагностики злокачественной меланомы и её метастазов на основе синтетического аналога α -меланоцитстимулирующего гормона (САГ) и радионуклида Тс-99m.

Цель. Выбор оптимальных условий получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc и изучение в экспериментах *in vitro* возможности использования его в качестве диагностического средства.

Материалы и методы. Проведена экспериментальная работа по оптимизации условий получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc. Изучены связывание и интернализация этого соединения клетками меланомы линии В16-F0.

Результаты и обсуждение. Получены результаты меченая САГ радионуклидом ^{99m}Tc в широком диапазоне условий, как прямым методом, так и с использованием промежуточного комплекса. Целевое соединение быстро связывается с клетками меланомы В16-F0. Степень интернализации более 85 %.

Заключение. По результатам химических опытов и данных экспериментов *in vitro* найдены оптимальные условия получения комплексного соединения САГ · ^{99m}Tc с радиохимическим выходом более 90 %. Подтверждены специфичность и рецепторный механизм связывания изученного соединения с клетками меланомы.

Ключевые слова: злокачественная меланома, меланоцитстимулирующий гормон, Тс-99m, оптимизация, В16-F0.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. О. Е. Клементьева, А. Б. Брускин и Г. Е. Кодина обосновали актуальность исследования и разработали модель эксперимента, В. Б. Бубенчиков и А. Б. Брускин выполнили экспериментальные радиохимические работы. К. А. Лунёва и К. Э. Терновская выполнили эксперименты с культурами клеток и участвовали в обработке полученных данных совместно с А. С. Лунёвым. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках Госконтракта № 14.N08.12.0032 программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Для цитирования: Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёва К. А., Бубенчиков В. Б., Терновская К. Э., Лунёв А. С., Кодина Г. Е. Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-66-71>

Development of Radiopharmaceutical Composition for Radionuclide Diagnostics of Malignant Melanoma

Olga E. Klementyeva¹, Alexander B. Bruskin^{1*}, Kristina A. Lunyova¹, Viktor B. Bubenshchikov¹,
Kristina E. Ternovskaya¹, Aleksandr S. Lunev¹, Galina E. Kodina¹

1 – State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency (SRC – FMBC), 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

*Corresponding author: Aleksandr B. Bruskin. E-mail: raphar@mail.ru

ORCID: Olga E. Klementyeva – <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>; Alexander B. Bruskin – <https://orcid.org/0000-0002-0563-9669>;
Kristina A. Lunyova – <https://orcid.org/0000-0002-8392-8343>; Viktor B. Bubenshchikov – <https://orcid.org/0000-0002-2348-4269>;
Kristina E. Ternovskaya – <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>; Aleksandr S. Lunev – <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>;
Galina E. Kodina – <https://orcid.org/0000-0002-3415-4329>.

Received: 21.07.2020. Revised: 19.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Skin cancers came first in Russia in numbers of oncological diseases. Melanoma, making up only a small part of these cases, leads to the most serious consequences. The nuclear medicine methods application is necessary at the stages of clarifying the diagnosis, searching for remote metastases and the treatment monitoring. The work is devoted to one of the stages of the radiopharmaceutical development for the diagnostics of malignant melanoma and its metastases based on the synthetic analog of α -melanocyte stimulating hormone (SAH) and radionuclide Tc-99m.

© Клементьева О. Е., Брускин А. Б., Лунёва К. А., Бубенчиков В. Б., Терновская К. Э., Лунёв А. С., Кодина Г. Е., 2020

© Klementyeva O. E., Bruskin A. B., Lunyova K. A., Bubenshchikov V. B., Ternovskaya K. E., Lunev A. S., Kodina G. E., 2020

Aim. The selection of optimal conditions for the preparation of the SAH · ^{99m}Tc complex and the study of the using possibility it as a diagnostic tool in *in vitro* experiments.

Materials and methods. Experimental work was carried out to optimize the conditions for obtaining the complex compound SAH · ^{99m}Tc. The binding and internalization of this compound by B16-F0 melanoma cells has been studied.

Results and discussion. The results of labeling SAH with a ^{99m}Tc radionuclide under a wide range of conditions were obtained both by the direct method and using the intermediate complex. The target compound rapidly binds to B16-F0 melanoma cells. The degree of internalization is more than 85 %.

Conclusion. Based on the results of chemical experiments and data from *in vitro* experiments, optimal conditions for obtaining a complex compound SAH · ^{99m}Tc with a radiochemical yield of more than 90 % were found. The mechanism of binding of this compound to malignant melanoma cells has been established.

Keywords: malignant melanoma, melanocyte-stimulating hormone, technetium-99m, optimization.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Olga E. Klementyeva, Alexander B. Bruskin and Galina E. Kodina justified the relevance of the study and developed a model of the experiment, Viktor B. Bubenshchikov and Alexander B. Bruskin performed experimental radiochemical work. Kristina A. Lunyova and Kristina E. Ternovskaya performed experiments with cell cultures and participated in the processing of the data obtained together with Aleksandr S. Lunev. All authors participated in the discussion of the results and in writing the text of the article.

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the State Contract No. 14.N08.12.0032 of the program «Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond».

For citation: Klementyeva O. E., Bruskin A. B., Lunyova K. A., Bubenshchikov V. B., Ternovskaya K. E., Lunev A. S., Kodina G. E. Development of radiopharmaceutical composition for radionuclide diagnostics of malignant melanoma. *Razrabotka i registratsiya lekarnykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-66-71>

ВВЕДЕНИЕ

В 2018 году в России меланома вышла на одну из лидирующих позиций по числу больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования [1]. И хотя меланома составляет лишь примерно 1/8 случаев рака кожи, именно она приводит к самым тяжелым последствиям [2]. При этом смертность от меланомы растет на фоне снижения стандартизованного показателя [3]. Конечно, ранняя диагностика меланомы возможна и без применения высокотехнологичных методов, к которым относится и ядерная медицина. Однако на стадии уточнения диагноза, поиска отдаленных метастазов и контроля лечения методы ядерной медицины крайне необходимы. Применение основного радиофармпрепарата ПЭТ-диагностики – 2-[¹⁸F]фтордезоксиглюкозы – было достаточно успешным в некоторых случаях, однако способность этого препарата накапливаться не только в опухолевых очагах, но и в очагах воспаления очень часто значительно затрудняет диагностику. Другой подход к визуализации злокачественной меланомы – использование в качестве вектора пептидов, аффинных к той или другой структуре опухоли. Злокачественное перерождение меланоцитов связано с продукцией факторов роста и экспрессией рецепторов, которые не вырабатываются нормальными меланоцитами. Этот список включает в себя фактор роста фибробластов, трансформирующие факторы роста альфа и бета, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкины, гормон роста, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста стволовых клеток и некоторые другие. Любой

из них может служить мишенью, но чаще всего в качестве мишени служат меланокортиновый рецептор 1 типа, меланин и опухоль-ассоциированные интегрины. Большинство работ посвящено использованию α-меланоцитстимулирующего гормона (α-МСГ), связывающегося в наномолярных концентрациях с рецептором MC1R, гиперэкспрессируемым на поверхности клеток подавляющего большинства меланом человека, при этом экспрессия MC1R в клетках меланомы является не только особенностью, связанной с происхождением данного типа опухолей, но напрямую связана с активацией деления клеток и способностью к метастазированию [4, 5].

Цель настоящего исследования – разработка состава радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) для диагностики злокачественной меланомы на основе синтетического аналога α-МСГ (САГ) и радионуклида ^{99m}Tc и экспериментальное изучение *in vitro* эффективности его применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и реактивы

Натрия тартрат (ГОСТ 5845-79), динатрий фосфат (ГОСТ 4172-76), тринатрий фосфат (ГОСТ 201-76), пептид X-Lys¹(Bz-SCH₂CO-Gly-Gly-Gly)-c(Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys⁷-NH₂) (Синтез пептидов, Москва), олово дихлорид ≥99,99 % (Sigma-Aldrich, США), натрия хлорид (х.ч., ГОСТ 4233-77), ацетонитрил для хроматографии, сорт 1, (ГОСТ 3652-69), аргон (ГОСТ 10157-79, высш. сорт), пластины для тонкослойной хроматографии ITLC-SG (Sigma-Aldrich, США).

Оборудование

Генератор технеция-99m ГТ-2М или ГТ-4К (Россия), доз-калибратор АТОМЛАБ-500 (Biodex Medical Systems, Inc., США), сканер радиохроматограмм MiniGita (Elysia-raytest GmbH, Германия), весы аналитические Discovery Ohaus, pH-метр Sartorius PP-20, автоматический гамма-счетчик Wizard 2480-0010 (PerkinElmer LAS/Wallac, США), инкубатор CO₂ MCO-15AC (Sanyo, Япония), бокс микробиологической безопасности БМБ-II-Ламинар-С (ЗАО «Ламинарные системы»).

Для исследований использовался раствор натрия пертехнетата, ^{99m}Tc, получаемый из генераторов согласно инструкции производителя. Раствор радионуклида использовали без дополнительной очистки.

Для операции мечения в пробирки типа Эппендорф, содержащие раствор пептида, добавляли соответствующий буферный раствор, насыщенный аргонном, раствор дихлорида олова и 100–1000 мкл элюата генератора Tc-99m. Пробирки инкубировали с перемешиванием при температуре 25 или 95 °C в течение 15, 30, 60 и 120 мин.

Анализ препарата методом БТСХ проводился на пластинках типа ITLC-SG. На каждую из пластинок длиной 50 мм на расстоянии 10 мм от края наносили аликвоту САГ · ^{99m}Tc и хроматографировали восходящим методом до достижения фронтом растворителя линии на расстоянии 5 мм от другого края. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил/вода 2:1 (об.) или 20 % раствор NaCl в воде. Затем определяли распределение активности с помощью сканера радиохроматограмм или радиометрической установки. В последнем случае полоску разрезали на 2 равные части. Содержание радиоактивных веществ в стартовой части каждой из хроматограмм рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{старт}}, \% = \frac{A_{\text{старт}}}{A_{\text{старт}} + A_{\text{фронт}}} \cdot 100,$$

где $A_{\text{старт}}$ – активность стартовой части хроматограммы; $A_{\text{фронт}}$ – активность другой половины хроматограммы.

Полученные результаты относительной активности стартовых частей хроматограмм использовали для расчета радиохимической чистоты препарата по формуле:

$$\text{РХЧ} = A_{\text{NaCl}} - A_{\text{ацет}}$$

где A_{NaCl} – активность стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента 20 % раствора NaCl в воде, в %; $A_{\text{ацет}}$ – активность стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода (2:1), в %; РХЧ – радиохимическая чистота препарата, в %.

Эксперименты *in vitro* проведены на культуре опухлевых клеток-биомитенов, положительных к меланоцитстимулирующему гормону (мышинная меланома В16-F0, α-МСГ+). В качестве сравнительной тест-системы были использованы фибробласты кожи челове-

ка PCS-201-012 (α-МСГ-). Образцы культур клеток получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) в виде замороженных стоков.

Клетки культивировали в среде следующего состава: среда RPMI-1640 и среда Eagle MEM (из полнокомпонентной смеси фирмы Gibco) в соотношении 3:1 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки – 5 %, L-глутамин – 200 мМ и гентамицин 10 ед/мл в CO₂-инкубаторе при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Для анализа динамики связывания клетками образцов препарата в суспензию $1 \cdot 10^6$ клеток (в трипле-тах на каждую временную точку) вносили 100 мкл исследуемого раствора с объемной активностью 3,7 МБк/мл. Клетки инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 15, 30 и 60 минут. Затем радиоактивный раствор удаляли с помощью последовательно трижды повторяемых процедур: осаждения центрифугированием и промывания раствором Хэнкса. Отдельно готовили эталон, представляющий собой 1 мл среды, содержащий 100 мкл САГ · ^{99m}Tc с объемной активностью 3,7 МБк/мл. Радиоактивность каждой пробы и эталона измеряли на автоматическом гамма-счетчике. Уровень общего накопления (связывания) оценивали по формуле:

$$N = \frac{A_i}{A_e} \cdot 100,$$

где A_i – счет пробы клеток, имп/мин; A_e – счет эталона, имп/мин.

Для оценки степени интернализации в 1 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^6$ клеток, вносили 50 мкл исследуемого САГ · ^{99m}Tc (объемная активность 3,7 МБк/мл). Пробирки с клетками помещали в инкубатор и инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе в течение 15, 30 и 60 минут. Для разделения фракций САГ · ^{99m}Tc, связанных с поверхностными мембранами и цитоплазматическими структурами клеток, использовали глициновый буферный раствор (50 мМ глициновый буферный раствор pH 2,8, 0,1 М NaCl). Интернализацию определяли как отношение поглощенной структурами клеток активности к общей активности, связанной с клетками по формуле:

$$И = \frac{A_k}{A_k + A_m} \cdot 100,$$

где A_m – счет от смыва с мембран, имп/мин; A_k – счет от суспензии клеток, имп/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве векторной молекулы для доставки радионуклида в данной работе был использован пептидный аналог α-меланоцитстимулирующего гормона. α-МСГ представляет собой пептид, состоящий из 13 аминокислот (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂). Его аминокислотная последовательность одинакова у многих видов

млекопитающих – человека, мыши, крупного рогатого скота и т. д. α -МСГ может связываться с четырьмя типами меланокортиновых рецепторов человека (MCR), кроме MC2R, однако обладает наиболее высоким сродством и наиболее специфичен к MC1R. Для улучшения параметров биокинетики лекарственного средства используется не сам α -МСГ, а его пептидный аналог, содержащий ключевую аминокислотную последовательность (выделена тёмным в формуле выше), отвечающую за связывание с рецепторами MC1R. В качестве объекта исследования использовали синтетический пептид (САГ) X-Lys¹(Bz-SCH₂CO-Gly-Gly-Gly)-c(Asp-His-**DPhe-Arg-Trp**-Lys⁷-NH₂). Выбор такой структуры обусловлен рядом факторов. Для увеличения протеолитической стабильности потенциального радиофармпрепарата в физиологических условиях карбоксильная группа С-концевого лизина была заменена амидной группой. Для введения хелатообразующей группы к N-концевой части пептида был присоединен дополнительный остаток лизина, α -аминогруппа которого свободна или ацилирована для увеличения устойчивости пептида к действию аминопептидаз. Для увеличения устойчивости пептида к действию эндопептидаз введен остаток D-фенилаланина. Кроме того, адресный пептид получен в циклической форме: между β -карбоксильной группой аспарагиновой кислоты и ϵ -аминогруппой С-концевого лизина замкнута амидная связь, поскольку известно, что циклизация – это наиболее эффективный способ получения протеолитически устойчивых пептидов [6, 7]. В качестве хелатообразующей группы для введения радиоизотопа ^{99m}Tc было решено использовать меркаптоацетилтриглицин (MAG₃), который ковалентно связан с ϵ -аминогруппой N-концевого остатка лизина. Эта группа образует устойчивые комплексы с технецием и хорошо подходит для синтеза пептидов как твердофазным, так и классическим методами [8]. Были синтезированы 3 варианта пептида, отличающиеся заместителем у концевой лизина (X = H, OAc или Boc). Свободный амин оказался нестабильным соединением, даже при хранении –18 °С вскоре проявляется изменение окраски образца, что говорит о его деградации. Трет-бутильное производное стабильно при хранении, но очень плохо растворимо в воде. Поэтому дальнейшие работы проводились с ацильным производным, сочетающим хорошие стабильность и растворимость.

Первой стадией работы по мечению пептидного фрагмента была разработка метода анализа радиохимической чистоты (РХЧ, доля радионуклида, находящегося в необходимой химической форме [9]) препарата с достаточной точностью простым и доступным способом. Исходя из этого, был выбран метод планарной хроматографии, как наиболее наглядный и в то же время точный и простой. Было найдено, что для обнаружения возможных компонентов реакционной смеси лучше всего использовать метод быстрой тонкослойной хроматографии (БТСХ, ITLC) на пластинках ITLC-SG. Этот метод нашел широкое применение в последнее время прежде всего для анализа РФЛП на основе пептидов. Мы нашли, что при использовании в

качестве элюента 10 % или 20 % раствора NaCl пертехнетат-ион и комплекс ^{99m}Tc с промежуточным лигандом движутся с фронтом растворителя. При использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода в соотношении 2:1 по объему на старте остаются только восстановленные гидролизованные формы технеция (ГВТ), а все остальные меченые соединения движутся с фронтом растворителя. При использовании этих систем хроматографирование проходит быстро и занимает не более 5 минут. Таким образом, по результатам хроматографирования в указанных условиях, РХЧ препарата можно вычислить как разницу активности на стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента 20 % раствора NaCl в воде (целевой комплекс плюс ГВТ), и активности стартовой части хроматограммы при использовании в качестве элюента смеси ацетонитрил – вода (2:1) (ГВТ).

При изучении возможности мечения САГ в качестве восстановителя использовали дихлорид олова (2+), который обычно входит в состав клинически используемых РФЛП. В качестве реакционной среды для прямого мечения исследовались фосфатный, цитратный, бикарбонатный и боратный буферные растворы в широком диапазоне pH (от 2,4 до 11,8). Буферные растворы выбирались с точки зрения минимального потенциального вреда пациенту. Мечение проводили при 25 и 95 °С, что соответствует обычным для клинических учреждений условиям получения РФЛП на основе Tc-99m при комнатной температуре и в кипящей водяной бане соответственно. Только мечение в фосфатном буфере привело к успеху (РХЧ > 93 %), но при pH реакционной смеси более 11. Такое значение pH не является оптимальным для инъекционного препарата. Увеличение температуры реакционной среды приводит к заметному падению РХЧ, что, скорее всего, связано с деструкцией пептида в таких условиях.

Другой возможный путь мечения пептидов, через промежуточный комплекс ^{99m}Tc, был исследован с использованием тартрата и глюконата натрия. При использовании тартрата успешное (РХЧ > 90 %) мечение можно осуществить в щелочной среде (pH > 10). При этом реакцию при комнатной температуре необходимо проводить не менее 1 ч, а при нагревании (95 °С) достаточно 20–30 мин. При использовании глюконата натрия в качестве дополнительного комплексона при проведении реакции при комнатной температуре во всем исследуемом диапазоне параметров реакции не удается достигнуть величины РХЧ выше 76 %. Однако повышение температуры реакции до 95 °С приводит к заметному росту РХЧ. Оптимальным является проведение реакции в течение 30 мин при pH реакционной смеси около 8.

С целью выбора оптимального состава препарата проведены эксперименты по изучению динамики накопления РФЛП в клетках меланомы B16 *in vitro*. Основным критерием выбора оптимального состава САГ · ^{99m}Tc являлась степень его связывания с клетками меланомы линии B16-F0. Были исследованы 3 образца радиофармпрепаратов следующего состава (на 1 мл) (таблица 1).

Таблица 1. Состав исследуемых образцов САГ · ^{99m}Tc

Table 1. SAH · ^{99m}Tc sample composition

Содержание Substance	№ 1	№ 2	№ 3
Пептид, мг Peptide, mg	0,0385	0,0625	0,0625
SnCl ₂ , мг SnCl ₂ , mg	0,023	0,037	0,040
Промежуточный лиганд Intermediate ligand	Натрия глюконат Sodium gluconate	Натрия тартрат Sodium tartrate	–
Количество лиганда, мг Quality of ligand, mg	7,7	7,7	
Буферный агент, мг Buffering agent, mg	6,5 (Na ₂ HPO ₄)	8,2 (Na ₃ PO ₄)	8,9 (Na ₃ PO ₄)
РХЧ, % Radiochemical purity, %	94,8	98,6	90,2
pH	8,6	9,8	11,2

Результаты *in vitro* экспериментов представлены на рисунке 1.

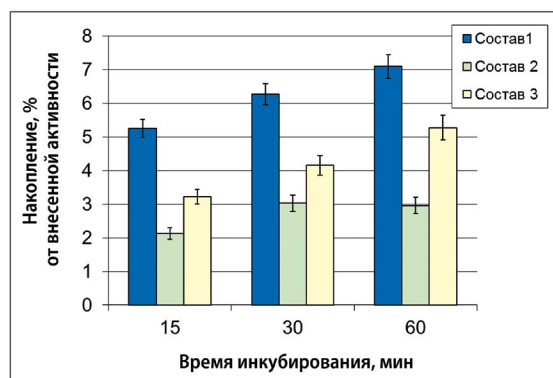


Рисунок 1. Связывание САГ · ^{99m}Tc с клетками меланомы B16-F0

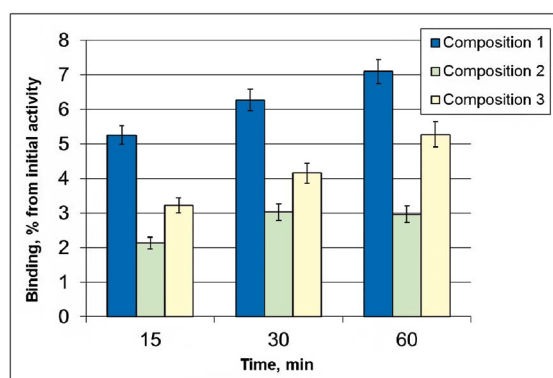


Figure 1. The SAH · ^{99m}Tc binding to B16-F0 melanoma cells

По результатам предварительных экспериментов *in vitro* был сделан выбор в пользу состава САГ · ^{99m}Tc, соответствующего образцу № 1, который был использован в дальнейшем для более тщательного изучения биологического поведения. Было изу-

чено общее накопление и интернализация препарата САГ · ^{99m}Tc положительными и отрицательными культурами клеток, целью которых были подтверждение специфичности исследуемого соединения. Результаты экспериментов по определению представлены в таблице 2.

Таблица 2. Динамика общего накопления и интернализации с использованием тест-системы сравнения

Table 2. The total accumulation and internalization using the test comparison system

	Линия клеток Cells line	
	B16-F0 (α-MCГ+)	PCS-201-012 (α-MCГ-)
Время инкубирования 15 минут Incubation time 15 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	4,12 ± 1,29	0,78 ± 0,15
Интернализация, % Internalization, %	79,7 ± 2,16	69,35 ± 6,2
Время инкубирования 30 минут Incubation time 30 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	5,18 ± 0,44	0,9 ± 0,08
Интернализация, % Internalization, %	85,89 ± 10,43	71,58 ± 5,9
Время инкубирования 60 минут Incubation time 60 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	6,5 ± 0,76	0,88 ± 0,17
Интернализация, % Internalization, %	94,02 ± 3,13	81,94 ± 7,95
Время инкубирования 90 минут Incubation time 90 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	7,17 ± 0,56	1,1 ± 0,08
Интернализация, % Internalization, %	94,72 ± 1,26	67,36 ± 11,68
Время инкубирования 120 минут Incubation time 120 min		
Общее накопление, % Total cell accumulation, %	7,19 ± 0,63	1,27 ± 0,1
Интернализация, % Internalization, %	95,35 ± 0,52	73,31 ± 16,01

Как показали исследования, препарат интенсивно поглощался опухолевыми клетками. Уровень общего накопления САГ · ^{99m}Tc в культуре клеток пигментированной мышинной меланомы линии B16-F0 составил от 4 до 7 % и был достоверно выше, чем накопление в клетках фибробластов кожи человека PCS-201-012 на всем протяжении эксперимента, что доказывает специфичность диагностического радиофармацевтического препарата на основе синтетического аналога природного α-меланоцитстимулирующего гормона, меченного технецием-99m.

Поскольку клетки меланомы PCS-201-012 не обладают рецепторами к α-MCГ, механизмы накопления и интернализации изучаемого соединения САГ · ^{99m}Tc не специфичны и, вероятнее всего, реализуются путем пассивной диффузии через липиды мембраны. При этом в каждый конкретный момент времени доля САГ · ^{99m}Tc, задержанного в липидном слое мемб-

раны и связанного с внутриклеточными структурами, может колебаться случайным образом. Поэтому при стабильном общем накоплении ($1,1 \pm 0,08$ через 90 минут и $1,27 \pm 0,1$ через 120 минут) интернализированная фракция, т. е. доля САГ · ^{99m}Tc проникшего внутрь клетки, изменяется случайным образом, что еще раз подтверждает рецепторный механизм действия САГ · ^{99m}Tc и неспецифичность накопления исследуемого препарата клетками, не обладающими соответствующими рецепторами.

Для подтверждения рецепторного механизма связывания препарата САГ с биологической мишенью изучали его накопление в присутствии агента, блокирующего целевые рецепторы к α -МСГ. В качестве такого блокирующего агента использовали раствор синтетического аналога природного альфа-меланоцитстимулирующего гормона Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys⁷-NH₂ в дозе 150 мкл на пробу с концентрацией 1 мкМ/мл. Также было проведено исследование накопления раствора сравнения, представляющего собой раствор ^{99m}Tc -пертехнетата натрия.

Результаты изучения динамики накопления радиофармацевтического препарата в присутствии блокирующего агента представлены в таблице 3. Как видно из полученных данных, в присутствии блокирующего раствора накопление САГ · ^{99m}Tc было достоверно в 6,1–7,3 раза ниже, чем в его отсутствии. Эти результаты подтверждают рецепторный механизм связывания САГ · ^{99m}Tc , а практически полное отсутствие накопления раствора сравнения говорит о высокой специфичности САГ · ^{99m}Tc к его биологической мишени.

Таблица 3. Динамика накопления САГ · ^{99m}Tc клетками меланомы B16-F0 (% от внесенной активности)

Table 3. The dynamics of SAH · ^{99m}Tc accumulation by melanoma cells B16-F0 (% of introduced activity)

Условия эксперимента Experiment Conditions	Время инкубирования, мин Incubation time, min		
	30	60	90
САГ · ^{99m}Tc SAH · ^{99m}Tc	$5,15 \pm 0,40$	$6,00 \pm 0,82$	$6,55 \pm 0,90$
САГ · ^{99m}Tc + блокирующий агент SAH · ^{99m}Tc + blocking agent	$0,87 \pm 0,18$	$0,82 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,12$
Раствор сравнения Comparison solution	$0,29 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,04$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Найден оптимальный состав, позволяющий получить радиофармацевтический лекарственный препарат на основе синтетического аналога α -МСГ (САГ) и радионуклида Тс-99m с выходом более 90 %.
2. Общее накопление исследуемого РФЛП в клетках меланомы линии B16-F0 происходит по рецепторному механизму.
3. Исследуемый препарат быстро и в значительной степени проникает во внутренние структуры клеток меланомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Статистический сборник 2018 год от 31 июля 2019 г. Министерство здравоохранения РФ. Доступно по: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>. Ссылка активна на 29.06.2020.
2. Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2017. National Cancer Institute. Released April 15, 2020. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/ Accessed: 25.05.2020.
3. Российский онкологический портал. Доступно по: <https://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-smernosti-ot-raka-v-rossii.html>. Ссылка активна на 15.06.2020.
4. Розенкранц А. А., Слостникова Т. А., Дурманов М. О., Соболев А. С. Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. *Биохимия*. 2013;78(11):1564–1575.
5. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *British Journal of Cancer*. 2002;87(4):414–422. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600441.
6. Zhang C., Lin K.-Sh., Benard F. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor. *Molecular Imaging*. 2017;16:1–15. DOI: 10.1177/1536012117737919.
7. Eberle A. N., Bhimsen R., Qi M. B., Bigliardi P. L. Synthetic Peptide Drugs for Targeting Skin Cancer: Malignant Melanoma and Melanotic Lesions. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(17):1797–1826. DOI: 10.2174/0929867324666170605105942.
8. Banerjee S. R., Maresca K. P., Francesconi L., Valliant J., Babich J. W., Zubieta J. New Directions in the Coordination Chemistry of ^{99m}Tc : A Reflection on Technetium Core Structures and a Strategy for New Chelate Design. *Nucl Med Biol*. 2005;32(1):1–20. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001.
9. ОФС.1.11.0001.15. Радиофармацевтические лекарственные препараты. Доступно по: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-11-0001-15-radiofarmatsevticheskie-lekarstvennye-preparaty/> Ссылка активна на 25.06.2020.

REFERENCES

1. Annual Statistic Report 2018 of July 31, 2019. Ministry of Health of the Russian Federation. Available at: <https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>. Accessed: 29.06.2020. (In Russ.).
2. Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2017. National Cancer Institute. Released April 15, 2020. Available at: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/ Accessed: 25.05.2020.
3. Russian Cancer Portal. Available at: <https://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-smernosti-ot-raka-v-rossii.html> Accessed: 15.06.2020. (In Russ.).
4. Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Durymanov M. O., Sobolev A. S. Malignant melanoma and melanocortin receptor 1. *Biokhimiya = Biochemistry*. 2013;78(11):1564–1575. (In Russ.).
5. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *British Journal of Cancer*. 2002;87(4):414–422. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600441.
6. Zhang C., Lin K.-Sh., Benard F. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor. *Molecular Imaging*. 2017;16:1–15. DOI: 10.1177/1536012117737919.
7. Eberle A. N., Bhimsen R., Qi M. B., Bigliardi P. L. Synthetic Peptide Drugs for Targeting Skin Cancer: Malignant Melanoma and Melanotic Lesions. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(17):1797–1826. DOI: 10.2174/0929867324666170605105942.
8. Banerjee S. R., Maresca K. P., Francesconi L., Valliant J., Babich J. W., Zubieta J. New Directions in the Coordination Chemistry of ^{99m}Tc : A Reflection on Technetium Core Structures and a Strategy for New Chelate Design. *Nucl Med Biol*. 2005;32(1):1–20. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2004.09.001.
9. Russia pharmacopoeia monograph 1.11.0001.15. Radiopharmaceutical drugs. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-11-0001-15-radiofarmatsevticheskie-lekarstvennye-preparaty/> Accessed: 25.06.2020. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-72-78>
УДК 615.451.16



Оригинальная статья/Research article

Влияние экстрагента разной концентрации на содержание биологически активных веществ в лекарственном препарате «Пустырника настойка»

Е. П. Рогожникова^{1,4*}, П. Г. Мизина², С. Г. Марданлы^{1,3,4}

1 – ЗАО «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская область, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1
2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1
3 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
4 – ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГГТУ), 142611, Россия, Московская область, г. Орехово-Зуево, ул. Зеленая, д. 22

*Контактное лицо: Рогожникова Елена Петровна. E-mail: ekolab-rogozhnikova@mail.ru

ORCID: Е. П. Рогожникова – <https://orcid.org/0000-0002-8725-4673>; П. Г. Мизина – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>; С. Г. Марданлы – <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>.

Статья поступила: 02.09.2020. Статья принята в печать: 22.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В работе рассмотрены пути оптимизации технологии получения настойки из пустырника травы при одновременном снижении содержания спирта этилового в готовом продукте. Изучены качественные и количественные показатели настойки в зависимости от использованного метода экстрагирования и концентрации экстрагента.

Цель. Изучить возможность снижения содержания спирта этилового в лекарственном препарате «Пустырника настойка».

Материалы и методы. Проведено сравнение количественных и качественных показателей образцов настоек, изготовленных методами перколяции, мацерации, дробной мацерации, модифицированной дробной мацерации. Проведено сравнение показаний к применению настойки и настоя из пустырника травы. Количественные показатели для сравнения образцов использовались: «Сухой остаток», «Содержание спирта этилового», «Микробиологическая чистота», «Количественное определение», «Качественные реакции» – наличие в образцах фенольных соединений, флавоноидов (качественные реакции, метод ВЭЖХ), иридоидов (метод ТСХ).

Результаты и обсуждение. Разработанный метод модифицированной дробной мацерации заключается в экстрагировании растительного сырья сначала более концентрированным экстрагентом (в нашем случае спиртом этиловым 80 %, 60 %, 40 %), затем последующее экстрагирование растительного сырья водой очищенной. Проведено сравнение наличия различных классов биологически активных веществ в настойках полученных разными технологическими методами и в настоях.

Заключение. Установлено, что наиболее рациональным является получение настойки методом модифицированной дробной мацерации с содержанием спирта этилового в готовом продукте не менее 35 %. Результаты данных исследований могут быть использованы в фармацевтической промышленности для получения лекарственных препаратов экстрактивными методами, а также для исследований оптимизации технологии получения экстрактивных препаратов из лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: пустырника настойка, перколяция, мацерация, дробная мацерация, модифицированная дробная мацерация, экстрагент, флавоноиды, иридоиды.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. П. Г. Мизина, С. Г. Марданлы, Е. П. Рогожникова спланировали эксперимент, обработку результатов, участвовали в обсуждении результатов, принимали участие в написании текста статьи. П. Г. Мизина, Е. П. Рогожникова изготовили экспериментальные образцы, выполнили практические исследования.

Для цитирования: Рогожникова Е. П., Мизина П. Г., Марданлы С. Г. Влияние экстрагента разной концентрации на содержание биологически активных веществ в лекарственном препарате «Пустырника настойка». *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-72-78>

Effect of Different Extractant Concentrations on the Content of Biologically Active Substances in Motherwort Tincture

Elena P. Rogozhnikova^{1,4*}, Praskovya G. Mizina², Saifuddin G. Mardanly^{1,3,4}

1 – CJSC EKOLab, 1, Budyonnogo str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russia
2 – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, 7/1, Green str., Moscow, 117216, 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
4 – State University of Humanities and Technology, 22, Zelenaya str., Orekhovo-Zuyev, Moscow region, 142611, Russia

*Corresponding author: Elena P. Rogozhnikova. E-mail: ekolab-rogozhnikova@mail.ru

ORCID: Elena P. Rogozhnikova – <https://orcid.org/0000-0002-8725-4673>; Praskovya G. Mizina – <https://orcid.org/0000-0001-6510-9603>; Saifuddin G. Mardanly – <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>.

Received: 02.09.2020. Revised: 22.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. This article considers the ways to optimize the motherwort tincture formulation while reducing the content of ethyl alcohol in the finished product. Qualitative and quantitative tincture test items depending on extraction method used and extractant concentration have been studied.

Aim. To study the possibility of reducing the content of ethyl alcohol in motherwort tincture.

© Рогожникова Е. П., Мизина П. Г., Марданлы С. Г., 2020

© Rogozhnikova E. P., Mizina P. G., Mardanly S. G., 2020

Materials and methods. Comparison of quantitative and qualitative test items of tincture samples prepared by percolation, maceration, fractional maceration, modified fractional maceration is carried out. Quantitative comparative test items: dry residue, ethyl alcohol content, microbiological purity, quantitation, qualitative reactions – the presence of phenolic compounds, flavonoids in the samples (qualitative reactions, HPLC), iridoids (TLC) was used.

Results and discussion. The developed method of modified fractional maceration consists in extracting herb materials with a more concentrated extractant (in the study, 80 %, 60 %, 40 % ethyl alcohol), then the subsequent extraction of herb materials with purified water. Comparison of the presence of different classes of biologically active substances in tinctures obtained by different technological methods and in infusions is carried out.

Conclusion. It has been established that the most rational method is to obtain a tincture by modified fractional maceration method with ethyl alcohol content NLT 35 % in the finished product. The obtained results can be used in pharmaceutical industry for drug production by extractive methods, as well as for studies on technology optimization for obtaining extractive drugs from medicinal herb materials.

Keywords: motherwort tincture, percolation, maceration, fractional maceration, modified fractional maceration, extractant, flavonoids, iridoids.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Praskovya G. Mizina, Saifuddin G. Mardany, Elena P. Rogozhnikova planned the experiment, processing the results, took part in the discussion of the results, took part in writing the text of the article. Praskovya G. Mizina, Elena P. Rogozhnikova made experimental samples, performed practical research.

For citation: Rogozhnikova E. P., Mizina P. G., Mardany S. G. Effect of different extractant concentrations on the content of biologically active substances in motherwort tincture. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-72-78>

ВВЕДЕНИЕ

На современном рынке лекарственных препаратов и по сей день остается актуальным наряду с развитием химического синтеза биологически активных веществ (БАВ) и успехами биотехнологии, получение лекарственных препаратов из растительного сырья. Галеновые препараты, основную группу которых составляют настойки, с давних времен используются в лечебной практике, как препараты с мягким терапевтическим действием, не токсичные, практически не имеющие побочных действий. Терапевтический эффект объясняется многокомпонентностью состава, одновременным присутствием различных классов соединений БАВ. Присутствие различных классов БАВ в настойках зачастую способствует увеличению лечебного эффекта, ускорению и усилению его наступления, снижению возможных побочных действий [1].

Присутствие спирта этилового в настойке пустырника является ограничением приёма данного препарата пациентами с заболеваниями печени и алкогольной зависимостью, беременными женщинами и детьми.

Фармакологическая активность препаратов пустырника травы

Фармакологическое действие как для настоя, так и для настойки это выраженное седативное, умеренное кардиотоническое действие (замедляет ритм и увеличивает силу сердечных сокращений), обладает умеренными гипотензивными свойствами. Показания к применению настоек и настоев из пустырника травы: повышенная нервная возбудимость, нарушение сна, неврастения, нейроциркуляторная дистония [2].

При сравнении признанного фармакологического действия и показаний к применению настоек и настоев из пустырника травы можно сделать однозначный вывод: при смене экстрагента (раствор этилового спирта и вода) фармакологическое действие и показания к применению вытяжек из растительного сырья остается идентичным. Следовательно, снижение концентрации этилового спирта при производстве настоек не приведет к значимому изменению фармакологического действия.

Цель данной работы заключена в определении возможности снижения концентрации спирта этилового в лекарственном препарате «Пустырника настойка».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изготовления опытных образцов использовали измельченную траву пустырника, соответствующую требованиям ГФ РФ, ФС.2.5.0034.15 «Пустырника трава» [3].

Основными БАВ растения являются флавоноиды: О-гликозиды кверцетина (рутин, изокверцитрин, кверцитрин, гиперозид), в траве присутствуют производные апигенина (генкванин, квинквелозид), иридоидные гликозиды (леонурид, аюгол, галиридозид, ацетилгарпагид, обуславливающие седативный эффект и горький вкус препаратов) [4–6]. Иридоидные гликозиды это гидрофильные соединения и могут экстрагироваться как водой, так и спиртом этиловым 70 %, поэтому экстрагентом для извлечения так же может быть использован 40 % этиловый спирт [7–9].

Полученные образцы настоек изготовлены методами перколяции, мацерации, дробной мацерации и модифицированной дробной мацерации, экстрагент – спирт этиловый 70 %, 40 % и 20 %. Ряд образцов был

получен методом модифицированной дробной мацерации: первичное экстрагирование растительного сырья проводили спиртом этиловым 80 % и 60 % затем водой очищенной, полученные экстракты объединяли и проводили осветление, и осаждение балластных веществ в настойке.

Испытания настоек проводили по показателям: «Подлинность, ТСХ» по ЛС-000538-060810 «Пустырника настойка» [10], «Подлинность», «Сухой остаток», «Содержание спирта» (метод дистилляции), «Количественное определение» по ГФ РФ, ФС.3.4.0007.18 «Пустырника травы настойка» [3], «Микробиологическая чистота» по ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», категория 3Б [3].

Подлинность

Метод ТСХ: 0,5 мл испытуемой настойки помещают в делительную воронку, прибавляют 5 мл воды и 6 мл смеси хлороформ – спирт 96 % (5:1), взбалтывают в течение 5 мин. Хлороформный слой фильтруют с 2 г натрия сульфата безводного. Операцию извлечения проводят дважды. Полученный фильтрат выпаривают на ротационном испарителе при температуре 50 °С досуха. Полученный остаток растворяют в 1,0 мл этилового спирта 96 % (испытуемый раствор).

На линию старта хроматографической пластинки наносят 50 мкл испытуемого раствора полосой длиной 20 мм. Используется хроматографическая пластинка «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ размером 10 × 15 см. Пробу на пластинке высушивают, помещают в хроматографическую камеру со смесью: хлороформ – метанол – вода (80:2:0,1). Хроматографируют восходящим методом на расстояние 10 см от линии старта. Пластинку сушат на воздухе, опрыскивают реактивом Штала (1,0 г п-диметиламинобензальдегида растворяют в смеси из 50 мл уксусной кислоты, 5 мл фосфорной кислоты концентрированной и 100 мл воды) и нагревают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 10 мин. Хроматограмма испытуемого раствора должна содержать две зоны сиреневого цвета с R_f около 0,2 и 0,9 (иридоиды).

Метод ВЭЖХ

Условия хроматографирования: хроматограф Shimadzu LC-20 AD/T LPGE KIT (Shimadzu, Япония), оснащенный детектором SPD-20AV, двумя насосами LC-20AD, термостатом CTO-20AC, автодозатором SIL-20AC. Колонка ZORBAX SB-C18 4,6 × 250 мм 5- μ m, наполнитель октадецилсиликагель, температура колонки 25 °С, скорости потока 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл, подвижная фаза – ацетонитрил для хроматографии, детектирование при 280 нм [11].

Стандартный раствор: раствор А – 25 мг (точная навеска) стандартного образца рутина (регистрационный номер Chemical Abstracts Service (CAS): 13239, серия 40355330, годен до 01.2020) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 5,0 мл метанола, доводят объем раствора ацетонитрилом до мет-

ки, перемешивают. 1,0 мл раствора А в мерной колбе вместимостью 50 мл доводят ацетонитрилом до метки, перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора: 5 мл образца настойки растворяют в ацетонитриле в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки, перемешивают.

Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы. Время удерживания рутина около 2,5 мин.

Сумма флавоноидов в пересчете на рутин

Сумму флавоноидов в пересчете на рутин во всех образцах определяли по методике из ФС.3.4.0007.18 «Пустырника травы настойка» [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При установлении подлинности хроматограммы испытуемых растворов всех опытных образцов настоек (образцы, полученные методом мацерации, перколяции, методом дробной мацерации, методом модифицированной дробной мацерации с содержанием спирта не менее 15 %, методом модифицированной дробной мацерации с содержанием спирта не менее 35 %, методом модифицированной дробной мацерации с содержанием спирта не менее 64 %) и настоя в видимой области содержали две зоны сиреневого цвета с R_f около 0,2 и 0,9 (иридоиды). Полученные результаты испытаний образцов по показателю «Подлинность» методом ТСХ представлены на рисунке 1.

Образцы настоек пустырника, полученные методом мацерации и перколяции при экстрагировании этиловым спиртом 20 %, имеют небольшие слабоокрашенные зоны сиреневого цвета с R_f около 0,2 и 0,9.

В образцах настоек соответствующих требованиям по показателям «Подлинность», «Сухой остаток», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота» ФС.3.4.0007.18 «Пустырника травы настойка» [3] и ЛС-000538-060810 [10] (70 ПП, 40 ПП, 70 МП, 40 МП, 70 ДМП, 40 ДМП, 65 МДМП, 35 МДМП) методом ВЭЖХ проводили исследования по качественному содержанию суммы флавоноидов. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 2–10. На рисунке 11 для сравнения представлена хроматограмма образца настойки 15 МДМП.

На хроматограммах настоек (рисунки 3–11) с разным содержанием спирта этилового и настоек, полученных разными технологическими методами, присутствуют флавоноиды по химическому строению родственные рутину. По времени удерживания пики совпадают со временем удерживания рутина раствора сравнения (рисунок 2). В диапазоне 1,0–3,0 минут на всех представленных хроматограммах присутствуют не идентифицированные пики разной интенсивности веществ характерных для настойки, так как данные пики отсутствуют на хроматограмме раствора сравнения.

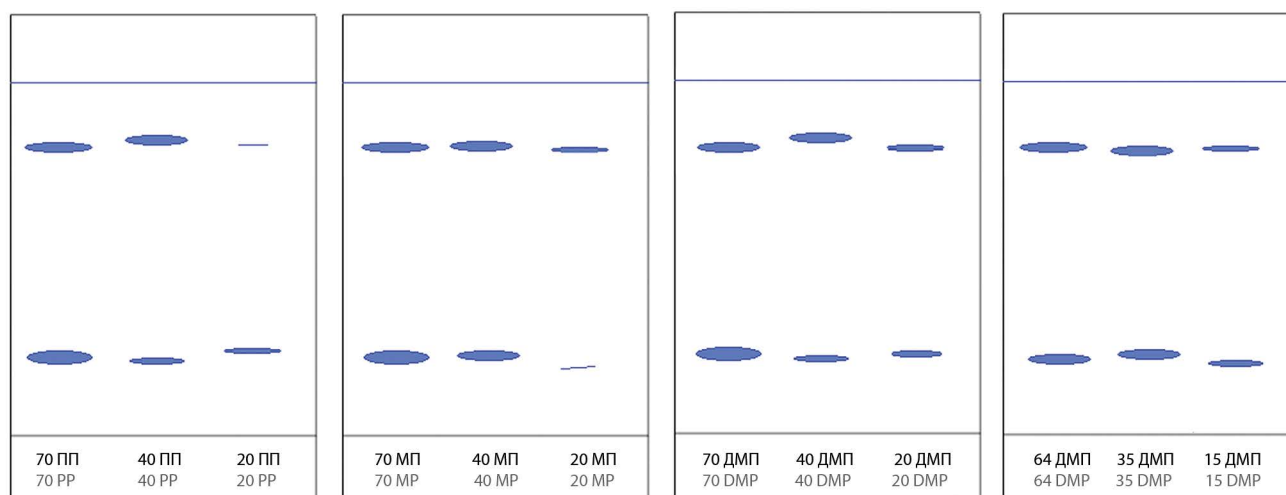


Рисунок 1. Схема ТСХ-хроматограммы образцов пустырника настойки (ПП – настойки, полученные методом перколяции; МП – настойки, полученные методом мацерации; ДМП – настойки, полученные методом дробной мацерации; МДМП – настойки, полученные методом модифицированной дробной мацерации с содержанием спирта в готовом продукте не менее 64 %, 35 %, 15 %)

Figure 1. TLC chromatograms of motherwort tincture samples (PP – tinctures obtained by percolation; MP – tinctures obtained by maceration; DMP – tinctures obtained by fractional maceration; MDMP – tinctures obtained by modified fractional maceration with not less than 64 %, 35 %, 15 % alcohol content in the finished product)

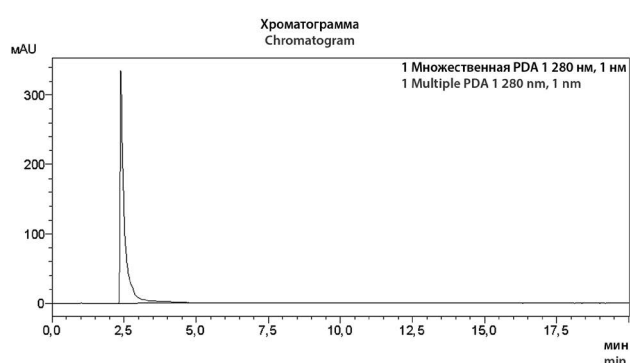


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного образца рутина
Figure 2. Rutin standard sample chromatogram

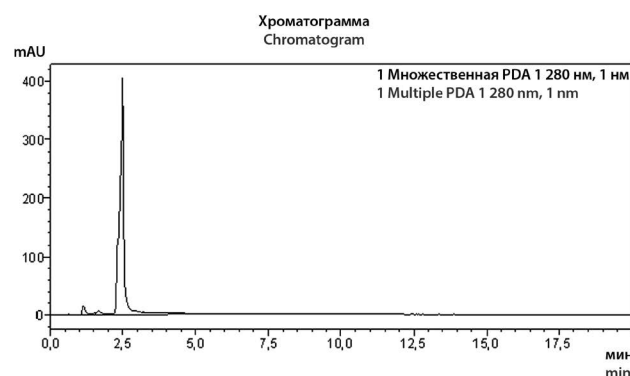


Рисунок 4. Хроматограмма образца пустырника настойки 40 ПП
Figure 4. 40 PP motherwort tincture sample chromatogram

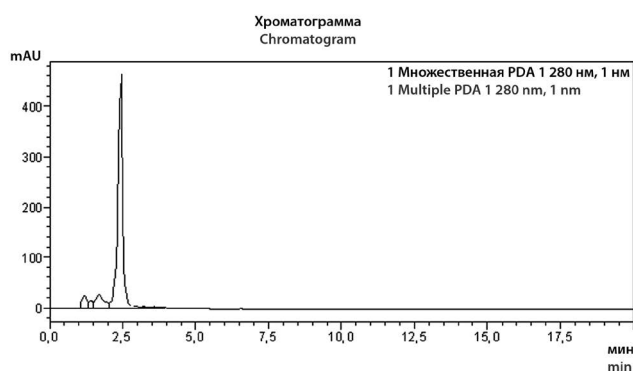


Рисунок 3. Хроматограмма образца пустырника настойки 70 ПП
Figure 3. 70 PP motherwort tincture sample chromatogram

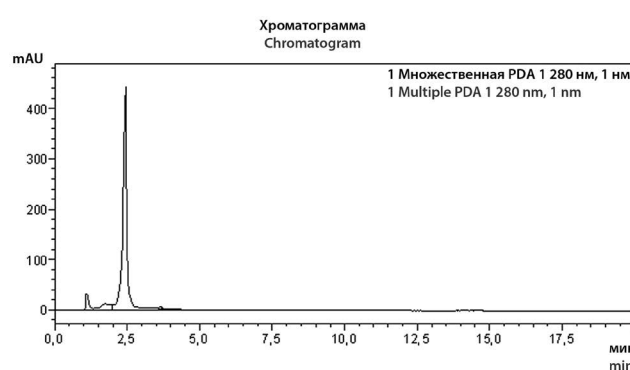


Рисунок 5. Хроматограмма образца пустырника настойки 70 МП
Figure 5. 70 MP motherwort tincture sample chromatogram

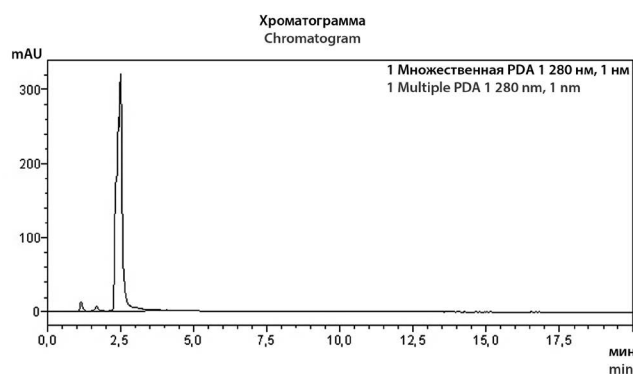


Рисунок 6. Хроматограмма образца пустырника настойки 40 МП

Figure 6. 40 MP motherwort tincture sample chromatogram

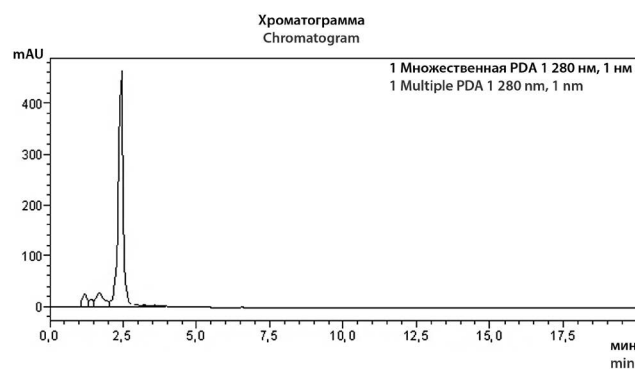


Рисунок 9. Хроматограмма образца пустырника настойки 65 МДМП

Figure 9. 65 MDMP motherwort tincture sample chromatogram

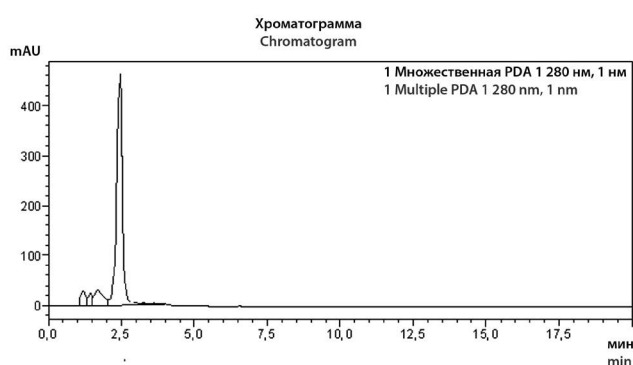


Рисунок 7. Хроматограмма образца пустырника настойки 70 ДМП

Figure 7. 70 DMP motherwort tincture sample chromatogram

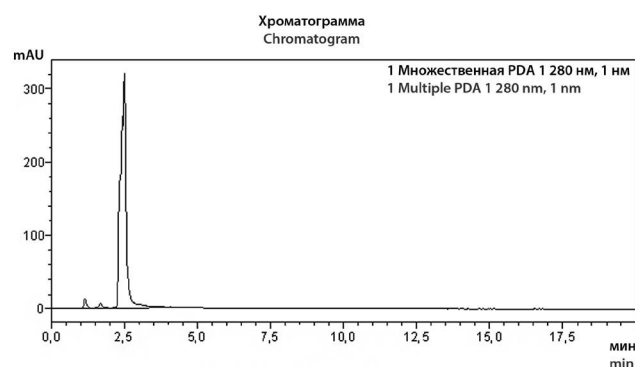


Рисунок 10. Хроматограмма образца Пустырника травы настойки 35 МДМП

Figure 10. 35 MDMP motherwort tincture sample chromatogram

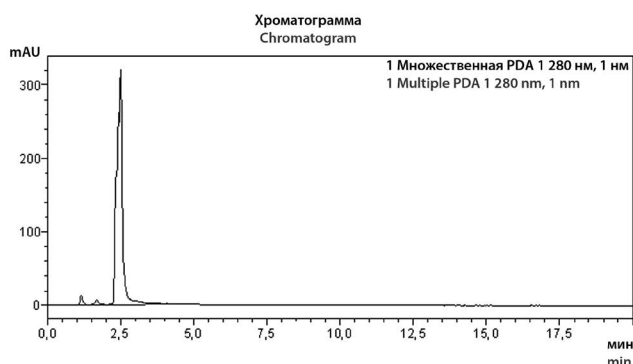


Рисунок 8. Хроматограмма образца пустырника настойки 40 ДМП

Figure 8. 40 DMP motherwort tincture sample chromatogram

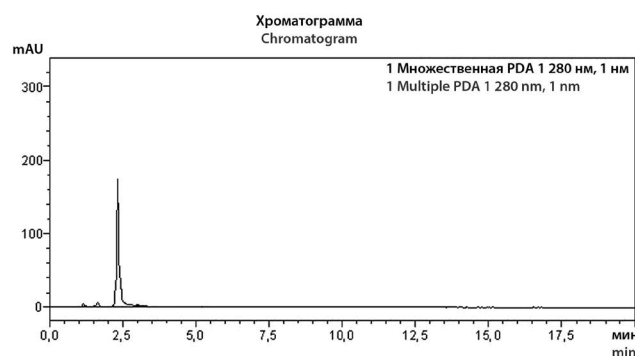


Рисунок 11. Хроматограмма образца Пустырника травы настойки 15 МДМП

Figure 11. 15 MDMP motherwort tincture sample chromatogram

В диапазоне от 1 до 4 минут на хроматограммах настоек присутствуют пики, относящиеся к веществам, экстрагируемым из растительного сырья.

Средние значения полученных результатов испытаний из пяти образцов настоек полученных разными методами представлены в таблице 1. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в исследу-

емых настойках составило от 0,014 до 0,031 %. Нормирование этого показателя в соответствии с ГФ РФ, ФС.3.4.0007.18 «Пустырника травы настойка» [3] и ЛС-000538-060810 [10] составляет не менее 0,02 %.

Содержание экстрактивных веществ (сухой остаток) в исследуемых образцах настоек составило от 1,14 % (у образца 05/40 МП) до 1,96 % (у образца

Таблица 1. Показатели качества Пустырника настойки

Table 1. Quality test items of motherwort tincture

Номер образца Sample number	Содержание сухого остатка (не менее 1,4 %) Dry residue content (not less than 1.4 %)	Содержание спирта, % Alcohol content, %	Подлинность (иридоиды – ТСХ, флавоноиды – ВЭЖХ) Authenticity (iridoids – TLC, flavonoids – HPLC)	Содержание суммы флавоноидов (не менее 0,02 %) Total flavonoid content (not less than 0.02 %)	Микробиологическая чистота (категория 3Б) Microbiological purity (category 3B)
01–05/70 ПП ¹ 01–05/70 PP ¹	1,48 ± 0,030	68 ± 0,785	Подтверждено Confirmed	0,028 ± 0,003	Соответствует Respond
01–05/40 ПП 01–05/40 PP	1,776 ± 0,026	37,8 ± 0,497	Подтверждено Confirmed	0,027 ± 0,003	Соответствует Respond*
01–05/20 ПП 01–05/20 PP	1,654 ± 0,033	17,6 ± 0,993	Подтверждено Confirmed	0,020 ± 0,001	Не соответствует Not correspond
01–05/70 МП ² 01–05/70 MP ²	1,516 ± 0,115	65,8 ± 0,497	Подтверждено Confirmed	0,026 ± 0,004	Соответствует Respond
01–05/40 МП 01–05/40 MP	1,44 ± 0,192	36,4 ± 0,608	Подтверждено Confirmed	0,02 ± 0,004	Соответствует Respond*
01–05/20 МП 01–05/20 MP	1,692 ± 0,039	16,6 ± 0,608	Подтверждено Confirmed	0,022 ± 0,002	Не соответствует Not correspond
01–05/70 ДМП ³ 01–05/70 DMP ³	1,558 ± 0,042	67,6 ± 0,608	Подтверждено Confirmed	0,025 ± 0,006	Соответствует Respond
01–05/40 ДМП 01–05/40 DMP	1,56 ± 0,018	36,4 ± 0,608	Подтверждено Confirmed	0,022 ± 0,001	Соответствует Respond*
01–05/20 ДМП 01–05/20 DMP	1,65 ± 0,008	16,2 ± 0,497	Подтверждено Confirmed	0,022 ± 0,001	Не соответствует Not correspond
06–10/64 МДМП ⁴ 06–10/64 MDMP ⁴	1,606 ± 0,061	65,8 ± 0,929	Подтверждено Confirmed	0,022 ± 0,001	Соответствует Respond
06–10/35 МДМП 06–10/35 MDMP	1,82 ± 0,076	35,2 ± 0,497	Подтверждено Confirmed	0,026 ± 0,001	Соответствует Respond
01–05/15 МДМП 01–05/15 MDMP	2,012 ± 0,099	21,6 ± 1,266	Подтверждено Confirmed	0,012 ± 0,004	Соответствует Respond

Примечание. 1 – Образцы пустырника настойки, изготовленные методом перколяции (ПП).

2 – Образцы пустырника настойки, изготовленные методом мацерации (МП).

3 – Образцы пустырника настойки, изготовленные методом дробной мацерации (ДМП), промышленная серия.

4 – Образцы пустырника настойки, изготовленные методом модифицированной дробной мацерации (МДМП).

* – Показатель «Микробиологическая чистота» соответствует категории 3Б, но имеет пороговые значения.

Note. 1 – Samples of motherwort tincture, made by the method of percolation (PP).

2 – Samples of motherwort tincture made by maceration (MP).

3 – Samples of motherwort tincture made by fractional maceration (DMP), industrial series.

4 – Samples of motherwort tincture, made by modified fractional maceration (MDMP).

* – The indicator «Microbiological purity» corresponds to category 3B, but has threshold values.

03/15 МДМП). Нормирование этого показателя в соответствии с ФС.3.4.0007.18 «Пустырника травы настойка» [3] и ЛС-000538-060810 [10] составляет не менее 1,4 %.

Использование методов мацерации перколяции, дробной мацерации при снижении содержания спирта этилового в экстрагенте при изготовлении настойки с содержанием спирта не менее 35 % позволяет получать препараты отвечающие требованиям ГФ РФ, ФС.3.4.0007.18 и ЛС-000538-060810 кроме показателя «Микробиологическая чистота», который имеет пороговые значения по содержанию анаэробных бактерий в 1 мл.

Методы мацерации, перколяции и дробной мацерации для изготовления настойки с концентрацией спирта этилового не менее 15 % не подходят, так как по показателю «Микробиологическая чистота» по

ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0002.18 [3] не соответствует требованиям категории 3Б.

Метод модифицированной дробной мацерации для изготовления настойки с концентрацией спирта этилового не менее 35 % и 15 % дает хорошие результаты по показателю «Микробиологическая чистота», так как первичное экстрагирование растительного сырья проводили спиртом этиловым 60 % затем водой очищенной. Спирт этиловый является хорошим дезинфицирующим средством в концентрации от 90 % до 40 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все образцы настоек, полученные методами мацерации, перколяции, дробной мацерации, модифицированной дробной мацерации с содержанием

спирта этилового в готовом продукте не менее 35 %, содержат больше экстрактивных веществ, чем настойки с содержанием спирта не менее 64 %.

Образцы настоек, полученные методом модифицированной дробной мацерации, при содержании спирта этилового не менее 35 % ($\Delta A = 0,0262$ %) содержат количественно сумму флавоноидов сравнимую с настойками, полученными при экстрагировании этиловым спиртом 70 % ($\Delta A = 0,0264$ %).

Экстрагирование этиловым спиртом с концентрацией 80 % и 60 % (образцы 06–10/64 МДМП, 06–10/35 МДМП) методом модифицированной дробной мацерации с получением в готовом продукте содержание спирта этилового не менее 64 % и 35 % дает результаты по количественным и качественным показателям соответствующие требованиям ГФ РФ, ФС.3.4.0007.18 и ЛС-000538-060810.

Согласно полученным данным, можно предположить, что метод модифицированной дробной мацерации с содержанием этилового спирта в готовой настойке не менее 35 % для получения пустырника настойки является перспективным.

Снижение содержания этилового спирта в лекарственном препарате «Пустырника настойка» не менее 35 % возможно при использовании метода модифицированной дробной мацерации и позволяет получать настойку с содержанием сухого остатка – $(1,820 \pm 0,076)$ %, содержанием суммы флавоноидов – $(0,026 \pm 0,001)$ % и отвечающей требованиям по показателям «Подлинность» и «Микробиологическая чистота». Использование методов мацерации, перколяции и дробной мацерации при получении настойки с содержанием этилового спирта в готовом препарате не менее 35 % возможно после дополнительных исследований по снижению микробиологической нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поцелуева Л. А. Настойки и жидкие экстракты в России и в зарубежье. *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2012;2:864–866.
2. Пустырника трава. Инструкция по применению. ЛП-004051-271216 Государственный реестр лекарственных средств. 2016. Доступно по: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
3. ГФ РФ. 2019. Доступно по: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
4. Жогова А. А., Перова И. Б., Самылина И. А., Эллер К.И., Раменская Г. В. Идентификация и количественное определение основных биологически активных веществ травы пустырника с помощью ВЭЖХ-масс-спектрометрии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2014;48(7):54–59.
5. Ким В. Э., Правдюк М. Ф., Коновалов Д. А., Хромато-масс-спектрометрическое исследование фитоэкстракта на основе травы пустырника, корней шлемника байкальского, корневищ с корнями синюхи голубой. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015;1:129–131.
6. Помазанов В. В., Марданлы С. Г., Борисов В. Ю. ЭКОлогическая ЛАборатория – Ваша домашняя аптечка растительных настоек, сиропов и масел. Владимир: *Транзит-ИКС*. 2012. 184 с.
7. Быстрова М. Н., Панина Г. А., Демидова М. А., Харитоновна Е. В., Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов в препаратах седативного сбора № 3. *Традиционная медицина*. 2011;5:174–177.
8. Хишова О. М., Голяк Ю. А., Фармакологическое действие и применение в медицине Пустырника сердечного. *Вестник фарма-ции*. 2003;4:54–56.
9. Данилов С. А., Штрыголь С. Ю., Степанова С. И. Пустырник: фитохимические особенности и новые грани фармакологических свойств. *Провизор*. 2011;9:27–30.
10. Нормативная документация ЗАО «ЭКОлаб» ЛС-000538-060810 «Пустырника настойка».
11. Тутельян В. А., Эллер К. И. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи. Учреждение Российской акад. мед. наук Науч.-исслед. ин-т питания РАМН. Москва: *Династия*. 2010. 180 с.

REFERENCES

1. Potselueva L. A. Tinctures and liquid extracts in Russia and abroad. *Zdorov'e – osnova chelovecheskogo potenciala: problemy i puti ih resheniya = Health is the basis of human potential: problems and solutions*. 2012;2:864–866. (In Russ.).
2. Motherwort herb. Instructions for use. LP-004051-271216 State Register of Medicines. 2016. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. (In Russ.).
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 2019. Available at: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (In Russ.).
4. Zhogova A. A., Perova I. B., Samylina I. A., Eller K.I., Ramenskaya G. V. Identification and quantification of the main biologically active substances of motherwort herb by HPLC-mass spectrometry. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(7):54–59. (In Russ.).
5. Kim V. E., Pravdyuk M. F., Konovalov D. A. Chromato-mass spectrometric study of phytoextract based on motherwort herb, skullcap roots, rhizomes with blue cyanosis roots. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2015;1:129–131. (In Russ.).
6. Pomazanov V. V., Mardany S. G., Borisov V. Yu. ECOlogical LABoratory – Your home first aid kit of herbal infusions, syrups and oils. Vladimir: *Transit-IKS*. 2012. 184 p. (In Russ.).
7. Bystrova M. N., Panina G. A., Demidova M. A., Kharitonova E. V. Comparative study of the content of the sum of flavonoids in sedative preparations No. 3. *Traditsionnaya meditsina*. 2011;5:174–177. (In Russ.).
8. Hesova O. M., Golyak Yu. a., Pharmacological action and application in medicine Motherwort heart. *Vestnik farmacii = Bulletin of pharmacy*. 2003;4:54–56. (In Belarus).
9. Danilov S. A., Strigol S. Yu., Stepanov S. I. Motherwort: phytochemical characteristics and new aspects of pharmacological properties. *Provizor*. 2011;9:27–30. (In Ukraine).
10. CJSC EKOlalab normative documentation LS-000538-060810 «Motherwort tincture». (In Russ.).
11. Tutelyan V. A., Eller K. I. Methods of analysis of minor biologically active substances of food. Establishment of the Russian Acad. honey. Sciences Sci.-issled. Institute of Nutrition of the Russian Academy of Medical Sciences. Moscow: *Dinastiya = Dynasty*. 2010. 180 p.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87>
УДК 615.453.6 + 615.014.21



Оригинальная статья/Research article

Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил

Д. В. Демченко^{1*}, Е. А. Джайн (Корсакова)², В. Ю. Балабаньян², М. Н. Макарова¹, В. Г. Макаров¹

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г. п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245

2 – Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1

*Контактное лицо: Демченко Дмитрий Валентинович. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru

ORCID: Д. В. Демченко – <https://orcid.org/0000-0003-3856-3936>; Е. А. Джайн (Корсакова) – <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>;

В. Ю. Балабаньян – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>; М. Н. Макарова – <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>; В. Г. Макаров – <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

Статья поступила: 09.09.2020. Статья принята в печать: 12.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил, как вещество предназначенное для лечения ВИЧ-1 инфекции, представляет научный интерес, но его низкая биодоступность при пероральном способе введения приводит к ограничению использования. Поэтому была поставлена задача увеличения его растворимости путем получения твердой дисперсии и впоследствии создание твердой лекарственной формы на ее основе.

Цель. Разработка состава и технологии таблеток на основе 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила с необходимыми технологическими свойствами, обеспечивающих максимально полное высвобождение действующего вещества *in vitro*.

Материалы и методы. Фармацевтическая субстанция 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила представляет собой кристаллический порошок. Относится к ФС с низкой растворимостью. В качестве матрицы для создания твердой дисперсии использовали лактозу, Kollidon® 17 PF, Kollidon® 30, Kollidon® VA64, Kollidon® 90F и ПЭГ-6000. Твердые дисперсии получали двумя методами – совместного плавления и испарения растворителя. Технологические свойства субстанции, таблетмасс и показатели качества таблеток определяли по методикам, описанным в ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. В статье приведены результаты разработки состава и технологии лекарственного препарата в форме таблеток на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил. Для улучшения биофармацевтических свойств 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацила применен технологический прием создания твердой дисперсии.

Заключение. Изучение профилей высвобождения показало, что создание твердой дисперсии с повидоном Kollidon 17PF позволило улучшить полноту и интенсивность высвобождения субстанции из таблеток в среду растворения.

Ключевые слова: 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил, терапия ВИЧ-инфекции, твердые дисперсии, фармацевтическая разработка, таблетки, растворение.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы Д. В. Демченко и Е. А. Джайн (Корсакова) планировали и осуществляли проведение экспериментальных исследований, статистическую обработку и анализ полученных результатов, написание текста статьи. В. Ю. Балабаньян и М. Н. Макарова проводили интерпретацию результатов и доработку текста. В. Г. Макаров осуществлял критический пересмотр текста публикации. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ГК №14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г., Уникальный идентификатор контракта RF----N0817X0148).

Для цитирования: Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Балабаньян В. Ю., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87>

Development and Biopharmaceutical Evaluation of Tablets Based on the Poorly Water-soluble Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil

Dmitry V. Demchenko^{1*}, Ekaterina A. Jain (Korsakova)², Vadim Yu. Balabanyan², Marina N. Makarova¹, Valerij G. Makarov¹

1 – Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine, 27/1, Lomonosovsky Avenue, Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Dmitry V. Demchenko. E-mail: demchenko.dv@doclinika.ru

ORCID: Dmitry V. Demchenko – <https://orcid.org/0000-0003-3856-3936>; Ekaterina A. Jain (Korsakova) – <https://orcid.org/0000-0003-0283-8598>;

Vadim Yu. Balabanyan – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>; Marina N. Makarova – <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>;

Valerij G. Makarov – <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>.

Received: 09.09.2020. Revised: 12.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil is a substance of scientific interest intended for the treatment of HIV-infection. However, its low bioavailability is a major limitation in successful drug delivery by oral route. Therefore, the objective of the present work was to enhance its solubility by using solid dispersion technique followed by the development of a solid dosage form.

© Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Балабаньян В. Ю., Макарова М. Н., Макаров В. Г., 2020

© Demchenko D. V., Jain (Korsakova) E. A., Balabanyan V. Yu., Makarova M. N., Makarov V. G., 2020

Aim. Development of the composition and technology of tablets based on 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil with the appropriate technological properties providing the most complete release of the active pharmaceutical ingredient (API) *in vitro*.

Materials and methods. The pharmaceutical substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil is a crystalline powder with poor solubility. Solid dispersions were prepared using Lactose, Kollidon® 17PF, Kollidon® 30, Kollidon® VA64, Kollidon 90F, and PEG-6000 as a carrier mostly in 1:4 ratio by two methods – co-melting and solvent evaporation. The technological properties of substance, tablet masses and tablet quality were determined according to the methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14th edition).

Results and discussion. Article shows the results of development of a medicine in the form of tablets based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. Solid dispersion technique was used to improve the biopharmaceutical properties of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil.

Conclusion. *In vitro* dissolution studies showed enhanced dissolution rate of the drug-loaded solid dispersion with Kollidon 17PF as a carrier as compared to pure drug.

Keywords: 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, HIV therapy, solid dispersions, pharmaceutical development, tablets, dissolution.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Dmitry V. Demchenko and Ekaterina A. Jain (Korsakova) planned and carried out experimental studies, statistical processing and analysis of the results, writing the text of the article. Vadim Yu. Balabanyan and Marina N. Makarova results interpretation, text finishing. Valerij G. Makarov carried out a critical revision of publication text. All authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The work was carried out with financial support from the state represented by the Ministry of Education and Science of Russia (Civil Code No. 14.N08.11.0154 dated June 02, 2017, Unique contract identifier RF ---- N0817X0148).

For citation: Demchenko D. V., Jain (Korsakova) E. A., Balabanyan V. Yu., Makarova M. N., Makarov V. G. Development and biopharmaceutical evaluation of tablets based on the poorly water-soluble substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87>

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия ВИЧ-инфекции является самой актуальной и до сих пор не решенной проблемой мирового здравоохранения. По данным федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом, по состоянию на июнь 2020 года в Российской Федерации было зарегистрировано более 1,4 миллиона ВИЧ-1 инфицированных. Всего за время наблюдения в России от СПИД и оппортунистических инфекций погибло более 370 тысяч человек [1]. Несмотря на то, что, по данным Роспотребнадзора, достигнут ряд позитивных изменений в эпидемиологической ситуации по ВИЧ-инфекции, и удалось снизить темпы прироста новых случаев ВИЧ-инфекции, тем не менее количество новых случаев выявления остается достаточно большим [2, 3].

Применяемые в настоящее время лекарственные препараты (ЛП) направлены на подавление одной из ключевых стадий развития инфекции – первичного контакта вируса с клеткой, проникновения, синтеза ДНК-провируса, его переноса в ядро и интеграцию в геном клетки-хозяина, синтеза и созревания новых вирионов. Высокая изменчивость ВИЧ-1 приводит к образованию множества мутантных форм вируса, часть из которых лекарственно-устойчивые. В связи с этим поиск средств, эффективно подавляющих мутантные формы ВИЧ-1, остается актуальным [4].

В настоящее время в комплексной терапии ВИЧ-инфекции и вызываемого ею СПИДа широко применяются нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ): невирапин, эфавиренз, этравирин, рилпивириин, доравирин. Несмотря на высокую активность и селективность действия указанных средств, основным их недостатком является быстрое

возникновение резистентных штаммов ВИЧ-1, что снижает эффективность дальнейшего лечения этими ЛП [5].

В результате многолетних исследований, проведенных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России под руководством профессора А. А. Озерова в сотрудничестве с учеными ИМБ РАН, вирусологами США и Западной Европы был открыт новый класс высокоактивных нуклеозидных ингибиторов вирусной репродукции [6, 7].

Соединение 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил (рисунок 1) показало высокую способность подавлять репродукцию ВИЧ-1 *in vitro*. Соединение также подавляло репродукцию мутантных штаммов ВИЧ-1 и имело профиль резистентности, близкий к таковому эфавиренза [6, 8].

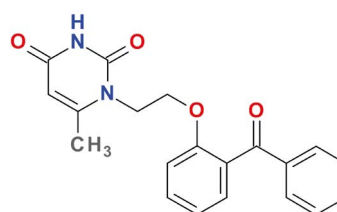


Рисунок 1. Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Figure 1. Structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil

Более 60 % новых фармацевтических субстанций (ФС), в настоящее время находящихся в процессе разработки, считаются малорастворимыми и

практически нерастворимыми в воде и органических растворителях [9]. Субстанция 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил относится к практически нерастворимым ФС. Таким образом, выбор ингредиентов для рецептуры, которые повысили бы степень растворения ФС для достижения лечебного эффекта, является важной задачей.

При разработке ЛП особое внимание уделяется исследованиям ключевых биофармацевтических свойств, влияющих на абсорбцию твердых лекарственных форм, таким как высвобождение ФС из лекарственной формы в раствор (растворимость и кинетика растворения), а также проницаемость. Именно они легли в основу биофармацевтической квалификационной системы (БКС), предложенной профессором Amidon с соавт. в 1995 г. и принятой FDA в 2001 г. в качестве рекомендаций по разработке теста «Растворение» [10].

Для повышения биодоступности ФС применяются различные технологические приемы повышения как растворимости, так и скорости растворения: измельчение или микронизация, полиморфизм и сольватация, получение твердых дисперсий (ТД), солюбилизация и т. д. [10, 11].

Получение ТД рассматривается как один из наиболее эффективных способов уменьшения размера частиц ФС до коллоидного и молекулярного уровня. Под воздействием среды растворимый матрикс полимера растворяется, и коллоидные частицы или молекулы ФС сразу же высвобождаются в среду растворения, вызывая быструю солюбилизацию ФС [12].

ТД получают с использованием кристаллических вспомогательных веществ (ВВ) (например, лактозы), полимеров [поливинилпирролидонов (ПВП), полиэтиленгликолей (ПЭГ), полиметакрилатов] либо поверхностно-активных носителей [12, 13].

Для приготовления ТД разработаны такие методы, как метод совместного измельчения, метод плавления, метод испарения растворителя (метод растворения) и метод совместного осаждения, однако чаще всего используются – метод плавления и метод растворения [14, 15].

В качестве носителей для создания ТД методом плавления используются: ПЭГ, полаксомеры и др. В качестве ВВ для создания ТД методом испарения растворителя в основном используют сахара и ПВП [16]. Одним из крупнейших производителей ПВП является немецкая фирма BASF, выпускающая различные марки ПВП (Kollidon®). Структура Kollidon® способствует образованию комплексных соединений с целым рядом ФС, что позволяет ПВП быть эффективным инструментом улучшения биодоступности [15, 17].

Целью настоящей работы стала разработка состава и технологии таблеток на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила с необходимыми технологическими свойствами, обеспечивающих максимально полное высвобождение действующего вещества *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- ФС – 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, синтезированную в ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, серия 001, дата изготовления: 05.07.2017, срок годности 3 года.
- вспомогательные вещества: микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (Comprecel, тип M102D+, Mintai Chemical Co Ltd., Тайвань); лактоза (Tabletose 100, Meggle, Германия); кросповидон (Kollidon CL, BASF, Германия); натрия крахмал гликолят (Primogel, DFE Pharma, Германия); кроскармеллоза натрия (Crest Cellulose, Индия); стеарат магния (NutriMag ST-v, Galmags, Германия); аэросил (aerosil 200 pharma, Evonik, Германия); повидоны (Kollidon 17 PF, Kollidon 30, Kollidon 90F, BASF, Германия); коповидон (Kollidon VA64, BASF, Германия); ПЭГ-6000 (Clariant, Германия).

Выбранные марки повидонов и коповидон имеют различные молекулярные массы и широко применяются в технологии готовых лекарственных форм (ГЛФ) для улучшения растворимости малорастворимых ФС [18, 19].

На момент проведения исследований ФС и вспомогательные вещества имели не истекшие сроки годности.

- оборудование для получения лекарственной формы:
 - лабораторные аналитические весы AUW-220D (Shimadzu, Япония);
 - ручной гидравлический пресс ПГПр (Россия);
 - настольный лабораторный пресс Korsch тип ЕКО (ERWEKA GmbH, Германия);
 - роторный испаритель IKA® RV 10 basic (IKA, Германия);
 - лиофильная сушилка ЛС-1000 (ООО «Проинтех», Россия).

Тест «Растворение» проводили на аппарате ERWEKA DT 600 (ERWEKA GmbH, Германия), тип аппарата II, при 50 оборотах в минуту. Объем среды растворения 500 мл. Отбор проб проводили через 5, 15, 30, 45, 60 минут, отбирали пробы по 3 мл. Пробу фильтровали через фильтр-насадки с диаметром пор 0,45 мкм и анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C18(2) 4,6×150 мм (Phenomenex, США).

В работе использовали реактивы квалификации «ч.д.а.» и «для ВЭЖХ».

Растворимость ФС определяли по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость»).

Форму и размер частиц определяли по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия»).

Для определения технологических характеристик полученных масс для таблетирования и ГЛФ использовали следующие методики:

- ✓ Внешний вид таблеток определяли визуально.

- ✓ Степень сыпучести, угол естественного откоса и насыпную плотность порошков оценивали по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков»). Результаты представлены в таблицах 1, 5.
- ✓ Прочность на истирание таблеток определялась при помощи тестера истираемости, PTF 20E (PHARMA TEST, Германия), прибор 1, по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток»). Результаты представлены в таблице 4.
- ✓ Распадаемость таблеток определяли при помощи тестера распадаемости твердых дозированных форм по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул»). Результаты представлены в таблицах 2, 4.
- ✓ Прочность таблеток определяли с помощью тестера твердости таблеток TH-1 (Hsiang Tai Machinery Industry Co., Тайвань), по методике, описанной в ГФ XIV (ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание»). Результаты представлены в таблицах 2, 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические и технологические свойства

1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил представляет собой кристаллический порошок светло-коричневого цвета ФС практически нерастворима в воде, 0,1 М соляной кислоте, фосфатном буферном растворе с pH 6,8, гексане, ацетоне, ацетонитриле; очень мало растворима в метаноле; мало растворима в хлороформе; умеренно растворима в ДМСО. Имеет однородный фракционный состав, частицы очень мелкие, форма частиц палочки, размеры частиц от 1 до 10 мкм.

Для порошков в виде палочек характерна высокая прессуемость, что объясняется наличием множества контактов между частицами, сложностью их внешней поверхности и легкостью взаимодействия при прессовании. Такие ФС, как правило, трудно поддаются переработке, трудно смешиваются с другими ВВ. Для субстанций, содержащих большое количество мелких фракций, характерно отсутствие сыпучести, что связано с резким увеличением сил внутреннего трения [20]. Однако у частиц 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила наблюдается гладкая поверхность кристаллов. Из литературы известно, что порошки, имеющие гладкую поверхность кристаллов, не обладают прессуемостью, поскольку частицы при прессовании легко скользят относительно друг друга, не образуя прочных прессовок. Кроме того, этим субстанциям присуща сыпучесть [20].

Для исследуемой ФС были изучены основные технологические свойства (таблица 1), такие как сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная плотность, прессуемость, а также рассчитаны индексы Хауснера и Кара.

Таблица 1. Основные технологические характеристики ФС

Table 1. The main technological characteristics of pharmaceutical substance

Показатель Parameters	Результаты Results
Сыпучесть, г/с; диаметр отверстия воронки 10 мм ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Flowability, g/s; funnel hole diameter 10 mm ($M \pm \sigma$), $n = 5$	14,0 $\pm$ 0,5
Угол естественного откоса, ° ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Angle of repose, ° ($M \pm \sigma$), $n = 5$	30,0 $\pm$ 1,0
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Bulk density before sealing, g/ml ($M \pm \sigma$), $n = 5$	0,67 $\pm$ 0,05
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Bulk density after sealing, g/ml ($M \pm \sigma$), $n = 5$	0,74 $\pm$ 0,05
Значение индекса Хауснера (H) Hausner index (H)	1,10
Значение индекса Кара (J), % Carr index (J), %	9,46

Установили, что ФС обладает очень плохой сжимаемостью (значения индекса Кара лежат в интервале до 10) и очень хорошей сыпучестью (значения индекса Хауснера – в интервале 1,00–1,11, а угол естественного откоса составляет 30°) [21]. Отсутствие прессуемости субстанции было подтверждено при получении модельных таблеток на ручном гидравлическом прессе ПГПр.

Оценка субстанции в тесте «Растворение»

В связи с низкой растворимостью ФС в воде и водных растворах проводили исследования в разных средах растворения с добавлением веществ, способствующих растворению субстанции. Для ФС, которым присуща низкая растворимость, возможно использование сред с ПАВ. Недопустимо использовать среды с концентрацией ПАВ более 2–3 % [22].

Для оценки субстанции в тесте «Растворение» выбрали среды растворения с достаточно большой концентрацией ПАВ, но не превышающей максимально допустимое нормирование: вода дистиллированная с добавлением 2 % твин-20; вода дистиллированная с добавлением 2 % твин-80; вода дистиллированная с добавлением 1 % додецилсульфат натрия (рисунок 2).

Внесение в среду ПАВ улучшило переход 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в среду растворения. Использование в качестве среды растворения воды дистиллированной с добавлением с 2 % твина-20 позволяло к 45 минутам эксперимента достичь наибольшего (порядка 20 %) растворения субстанции, вследствие чего данная среда растворения была использована в последующих экспериментах.

Технология получения ТД

Учитывая, что ФС практически нерастворима в воде и органических растворителях, повышение ее растворимости является важным вопросом, поскольку

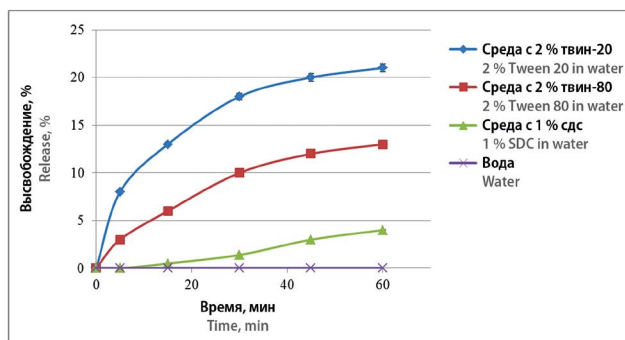


Рисунок 2. Профили высвобождения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в различные среды растворения

Figure 2. Dissolution profiles of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in various dissolution media

ку биодоступность и эффективность в значительной степени зависит от этой характеристики. Для улучшения растворимости проводили процесс иммобилизации ФС во ВВ.

С целью создания ТД использовали следующие ВВ: лактоза, Kollidon® 17PF, Kollidon® 30, Kollidon® VA64, Kollidon® 90F, ПЭГ-6000. Структура и свойства выбранных ВВ обеспечивают образование комплексных соединений с целым рядом ФС, что позволяет оптимизировать их биофармацевтические свойства [12].

Технология получения ТД с ПЭГ-6000

Композиции с ПЭГ-6000 готовили в различных соотношениях ФС : полимер (от 1:1 до 1:20) с применением метода совместного плавления.

Технология получения ТД с ПВП

Композиции с ПВП различных марок готовили в соотношении ФС : полимер 1:4. Технология получения ТД заключалась в предварительном растворении ФС в органическом растворителе (95 % спирте этиловом) при нагревании и последующем его внесении в раствор ПВП в воде с последующим перемешиванием до получения прозрачного раствора. После этого органический растворитель отгоняли на роторно-плечном испарителе (РПИ), а суспензию лиофильно высушивали.

Технология получения ТД с лактозой

Композицию с лактозой готовили в соотношении 1:4. Технология получения ТД заключалась в предварительном растворении ФС в органическом растворителе (95 % спирте этиловом) при нагревании, смешивании раствора с водой, отгоне части органического растворителя на РПИ. После этого добавляли раствор лактозы в воде и отгоняли оставшуюся часть органического растворителя, суспензию лиофильно высушивали. При использовании полимеров ПЭГ-6000,

Kollidon 30 и Kollidon 90F, создание ТД 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в выбранных соотношениях оказалось невозможным. Совместное плавление 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила с ПЭГ-6000 не привело к положительным результатам: растворимость ФС оставалась прежней. Создание ТД на основе повидонов Kollidon 30 и Kollidon 90F позволило повысить растворимость ФС, но их дальнейшее использование не представлялось возможным в связи с невозможностью измельчения полученных продуктов. Таким образом, для проведения дальнейших исследований использовали Kollidon 17PF, Kollidon VA64 и лактозу.

Создание ТД с Kollidon 17PF, KollidonVA64 и лактозой позволило улучшить высвобождение ФС в среду растворения. Из указанных ТД к 45 минуте эксперимента растворялось порядка 85–95 % ФС (рисунок 3).

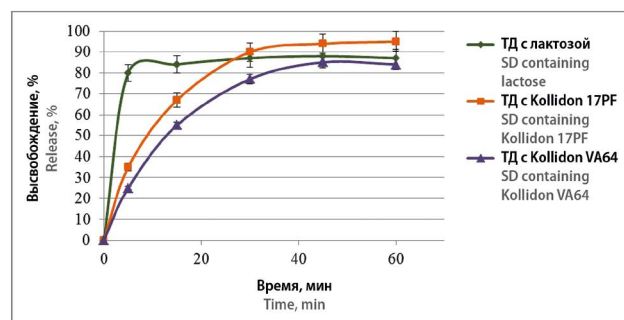


Рисунок 3. Профили высвобождения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила из ТД с Kollidon 17PF (1:4), Kollidon VA64 (1:4) и лактозой (1:4)

Figure 3. Dissolution profiles of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil from solid dispersion with Kollidon 17PF (1:4), Kollidon VA64 (1:4) and lactose (1:4)

Технология получения таблеток

Для получения ядра таблетки нами был выбран метод прямого прессования. Прямое прессование является современной, экономичной достаточно гибкой технологией, которая совершенствуется в связи с ростом фармацевтического рынка ВВ и появлением нового современного оборудования.

На основе полученных ТД, без добавления других ВВ, были сделаны модельные таблетки. Для таблеток были изучены показатели качества: прочность на раздавливание и распадаемость (таблица 2).

Создание ТД на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила также не привело к улучшению прессуемости массы, полученные таблетки плохо выталкивались из матрицы и не соответствовали требованиям ГФ XIV по прочности.

Наилучшие результаты по распадаемости показали ТД с лактозой и Kollidon 17PF. Для создания на их основе таблеток с удовлетворительными технологи-

ческими свойствами требовалось внесение в состав таблетмассы других ВВ.

Учитывая, что создание ТД влечет за собой увеличение массы таблеток, а также с учетом содержания в таблетке ФС в количестве 50 мг, разрабатывали состав таблеток с минимально возможным содержанием ВВ.

Таблица 2. Основные показатели качества таблеток на основе ТД

Table 2. The main quality indicators of tablets based on solid dispersion

Состав ТД SD composition	Показатели Parameters	
	Прочность, Н ($M \pm \sigma$), $n = 10$ Crushing strength of tablets, N ($M \pm \sigma$), $n = 10$	Распадаемость, мин ($M \pm \sigma$), $n = 6$ Disintegration, min ($M \pm \sigma$), $n = 6$
	Норма (ГФ XIV) Quality standard (State pharmacopoeia of Russian Federation XIV edition)	
	Не менее 30 Н Not less than 30 N	Не более 15 мин No more than 15 min
ТД с Kollidon 17PF SD containing Kollidon 17PF	19 ± 1	9,2 ± 0,2
ТД с Kollidon VA64 SD containing Kollidon VA64	27 ± 1	17,5 ± 0,3
ТД с лактозой SD containing lactose	12 ± 1	4,5 ± 0,2

Для создания таблеток большой массы наиболее предпочтительной формой является капсулообразная форма «облонги». Для их создания использовали пресс-инструменты для получения таблеток в виде облонгов 5 × 15 мм. Применение пресс-инструментов меньшего и большего размера либо не позволяло получить таблетки удовлетворительного качества, либо влекло за собой увеличение массы таблетки. В результате подбора наиболее подходящего пресс-инструмента также была выявлена оптимальная масса таблетки – 400 мг.

Разработанные составы представлены в таблице 3. В качестве разрыхлителей использовали: кросповидон, кроскармеллозу натрия, натрия крахмал гликолят в количестве, рекомендуемом производителем ВВ: до 10 % кросповидона, кроскармеллозы натрия от 4 до 7 %, натрия крахмал гликолята от 2 до 4 %.

Учитывая значительное влияние ФС на прессуемость, а также то, что таблетка на основе ТД плохо выталкивается из матрицы, в состав таблеток вносили наполнители и скользящие вещества. В качестве веществ, способствующих скольжению, использовали: магния стеарат в количестве 0,5 % и аэросил – 1 %. В качестве наполнителей использовали МКЦ, а также смесь МКЦ с лактозой в соотношении 1:2.

Для таблеток, получаемых методом прямого прессования, требуемые количества ингредиентов были взвешены и перемешаны до образования однородного порошка. Затем смеси были спрессованы с применением соответствующего оборудования – таблет-пресса Korsch (ERWEKA).

Таблица 3. Разработанные составы смесей для таблетирования

Table 3. The compositions of the mixtures for tableting

Номер состава Composition	Содержание веществ, мг Components, mg							
	ТД с лактозой SD containing lactose	ТД с Kollidon 17PF SD containing Kollidon 17PF	МКЦ MCC	Лактоза Lactose	Кросповидон Crospovidone	Кроскармеллоза натрия Croscarmellose sodium	Натрия крахмал гликолят Sodium starch glycolate	Аэросил Aerosil
1	250	–	144	–	–	–	–	4
2	250	–	124	–	20	–	–	4
3	250	–	104	–	40	–	–	4
4	250	–	128	–	–	16	–	4
5	250	–	116	–	–	28	–	4
6	250	–	136	–	–	–	8	4
7	250	–	128	–	–	–	16	4
8	–	250	144	–	–	–	–	4
9	–	250	124	–	20	–	–	4
10	–	250	104	–	40	–	–	4
11	–	250	128	–	–	16	–	4
12	–	250	116	–	–	28	–	4
13	–	250	136	–	–	–	8	4
14	–	250	128	–	–	–	16	4
15	–	250	48	96	–	–	–	4
16	–	250	41	83	20	–	–	4
17	–	250	34	70	40	–	–	4
18	–	250	43	85	–	16	–	4
19	–	250	38	78	–	28	–	4
20	–	250	45	91	–	–	8	4
21	–	250	43	85	–	–	16	4

Оценка таблеток

Оценку качества полученных таблеток проводили по следующим показателям: истираемость, распадаемость и прочность на раздавливание (таблица 4).

Из таблицы видно, что без внесения разрыхлителей время распадаемости превышало 15 минут, что не соответствует требованиям ГФ XIV (составы 1, 8, 15). Таблетки на основе ТД с лактозой (составы 1–7) лучше распадались по сравнению с таблетками на основе ТД

с повидоном. Таблетки на основе ТД с лактозой не соответствовали требованиям ГФ по прочности. Добавление смеси наполнителей в состав ТД с повидоном (составы 15–21) позволило улучшить технологические свойства таблеток.

Таблица 4. Основные показатели качества таблеток на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Table 4. The main quality indicators of tablets based on 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil

Состав Composition	Показатели Parameters		
	Истираемость, % ($M \pm \sigma$), $n = 10$ Abrasion of tablets, % ($M \pm \sigma$), $n = 10$	Прочность на раздавливание, Н ($M \pm \sigma$), $n = 10$ Crushing strength of tablets, N ($M \pm \sigma$), $n = 10$	Распадаемость, мин ($M \pm \sigma$), $n = 6$ Disintegration, min ($M \pm \sigma$), $n = 6$
	Норма (ГФ XIV) Quality standard (State pharmacopoeia of Russian Federation XIV edition)		
	Не менее 97 % Not less than 97 %	Не менее 30 Н Not less than 30 N	Не более 15 мин No more than 15 min
1	98,4 ± 0,2	35 ± 1	16,1 ± 0,5
2	96,0 ± 0,5	25 ± 1	9,2 ± 0,5
3	97,5 ± 0,5	27 ± 1	2,0 ± 0,1
4	97,1 ± 0,3	28 ± 1	12,2 ± 0,5
5	96,4 ± 0,2	26 ± 1	5,5 ± 0,2
6	95,5 ± 0,2	22 ± 1	10,0 ± 0,5
7	96,1 ± 0,1	20 ± 1	3,1 ± 0,1
8	99,7 ± 0,2	90 ± 2	25,7 ± 0,5
9	99,8 ± 0,5	78 ± 2	17,3 ± 0,5
10	99,5 ± 0,4	59 ± 2	10,1 ± 0,5
11	99,7 ± 0,4	72 ± 3	19,0 ± 0,5
12	99,6 ± 0,2	55 ± 3	11,6 ± 0,4
13	99,5 ± 0,1	64 ± 3	18,5 ± 0,5
14	99,5 ± 0,4	51 ± 1	9,1 ± 0,3
15	99,8 ± 0,4	73 ± 3	22,0 ± 0,5
16	99,7 ± 0,3	65 ± 2	12,2 ± 0,5
17	99,7 ± 0,2	58 ± 2	6,2 ± 0,2
18	99,8 ± 0,2	71 ± 3	17,3 ± 0,5
19	99,6 ± 0,1	50 ± 2	10,2 ± 0,3
20	99,7 ± 0,4	60 ± 1	15,0 ± 0,5
21	99,6 ± 0,4	55 ± 1	8,3 ± 0,3

Наилучшие результаты показал состав с разрыхлителем крошповидоном в количестве 10 % (состав 17). Были изучены основные технологические свойства таблетмассы наиболее оптимального состава 17 (таблица 5), такие как сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная плотность, прессуемость.

Полученные данные подтверждают правильность выбора оптимального состава: таблетмасса обладают средней сжимаемостью и хорошей сыпучестью.

Таблица 5. Основные технологические характеристики таблетмассы выбранного оптимального состава

Table 5. The main technological characteristics of tablet masses

Показатель Parameters	Результаты Results
Сыпучесть, г/с; диаметр отверстия воронки 10 мм ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Flowability, g/s; funnel hole diameter 10 mm ($M \pm \sigma$), $n = 5$	9,1 ± 0,5
Угол естественного откоса, ° ($M \pm \sigma$), $n = 5$ Angle of repose, ° ($M \pm \sigma$), $n = 5$	33,0 ± 2,0
Значение индекса Хауснера (Н) Hausner index (H)	1,21
Значение индекса Кара (J), % Carr index (J), %	18,1

Оценка таблеток в тесте «Растворение»

На рисунке 4 приведены результаты по изучению высвобождения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила из таблеток, содержащих в составе ТД с повидоном. Кроме того, проверяли влияние повидона на улучшение растворимости ФС. Для этого готовили физическую смесь, содержащую ФС и ВВ, аналогично составу 17, и далее получали таблетки на таблетпрессе Korsch (ERWEKA GmbH, Германия).

Полученные в тесте «Растворение» результаты (рисунок 4) показали, что создание таблеток на основе физической смеси также, как и в случае ТД, приводит к улучшению растворимости 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила за счет добавления в рецептуру солюбилизатора ПВП. Однако применение в таблетмассе физической смеси позволило высвободить только 53 % ФС к 45 минуте. Вместе с тем создание ТД с повидоном (Kollidon 17PF) позволило в полной мере улучшить полноту и интенсивность высвобождения субстанции в среду растворения. Так, в сравнении с ФС, высвобождение ФС из таблеток с ТД увеличилось в 4,3 раза.

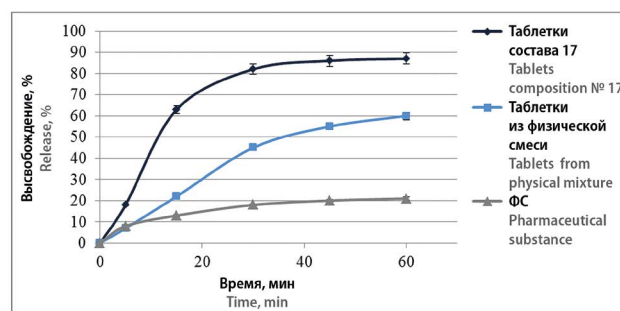


Рисунок 4. Профили высвобождения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила из таблеток состава № 17, таблеток из физической смеси и ФС

Figure 4. Dissolution profiles of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil from tablets composition № 17, tablets from physical mixture and pharmaceutical substance

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода твердых дисперсий позволило оптимизировать биофармацевтические свойства 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила путем повышения его растворимости, а также позволило разработать на его основе ЛФ.

Разработка и внедрение в медицинскую практику высокоэффективного и экономически рентабельного оригинального отечественного лекарственного препарата, содержащего ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, является не только социально значимой, но и экономически целесообразной задачей национального масштаба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 30 июня 2020 г. (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Доступно по: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/07/Spravka-VICH-v-Rossii-1-polugodie-2020.pdf>. Ссылка активна на 03.08.2020.
2. Противодействие ВИЧ и другим социально опасным заболеваниям: некоторые показатели за 6 лет. Правительство Российской Федерации от 11.04.2018. Доступно по: <http://government.ru/info/32200/>. Ссылка активна на 03.08.2020.
3. Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2019 г. (подготовлена в Федеральном научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Доступно по: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/02/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-na-31.12.2019.pdf>. Ссылка активна на 03.08.2020.
4. Прокофьева М. М., Кочетков С. Н., Прасолов В. С. Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы. *Acta Naturae*. 2016;8(4):26–36. DOI: 10.32607/20758251-2016-8-4-23-32.
5. Озеров А. А., Новиков М. С., Тимофеева Ю. А., Лобачев А. А., Луганченко А. И., Гейсман А. Н. Пиримидиновые ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы. *Вестник ВолГМУ*. 2012;3:10–17.
6. Петров В. И., Новиков М. С., Луганченко А. И., Озеров А. А., Погова Н. В. Кластерный подход к созданию биотехнологических лекарственных средств. *Медицинская этика*. 2014;1:28–31.
7. Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., Valuev-Elliston V. T., Temburnikar K., Ozerov A. A., Gurskaya G. V., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19:5794–5902. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
8. Озеров А. А., Новиков М. С., Луганченко А. И., Хартман Т., Бухайт Р. У. Новые N-[2-(Бензоилфенокси)этил] производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2012;4:15–18.
9. Баласубраманиам Д., Би Т. Влияние дезинтеграторов быстро-го действия на скорость растворения твердых лекарственных форм перорального применения. *Фармацевтическая отрасль*. 2010;4(21):92–99.
10. Демина Н. Б. Биофармацевтическая классификационная система как инструмент разработки дизайна и технологии лекарственной формы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2:56–60.
11. Ганичева Л. М., Вдовина Г. П. Биофармацевтические аспекты разработки, производства и применения лекарственных препаратов. *Вестник ВолГМУ*. 2012;3(43):3–9.
12. Краснюк (мл.) И. И., Овсянникова Л. В., Степанова О. И., Беляцкая А. В., Краснюк И. И., Харитонов Ю. Я., Грих В. В., Кошелева Т. М.,

Король Л. А. Применение твердых дисперсий с нестероидными противовоспалительными средствами в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;2:40–44.

13. Huang Y., Dai W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014;4(1):18–25. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.11.001.
14. Meng F., Gala U., Chauhan H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(9):1401–1415. DOI: 10.3109/03639045.2015.1018274.
15. Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;2:52–59.
16. Макаров В. Г., Макарова М. Н., Демченко Д. В. Способы повышения растворимости лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона. Патент РФ № 2729792. 12.08.2020.
17. Жиякова Е. Т., Агарина А. В., Новикова М. Ю., Иванова Л. Л. Применение различных загустителей-проникнователей марок коллидона в фармацевтической технологии. *Научный результат. Серия: Медицина и фармация*. 2016;2(4):95–100. DOI: 10.18413/2313-8955-2016-2-4-95-100.
18. Reintjes T. Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers Solubilizer Compendium. *Lampertheim: BASF*, 2011. 128 p.
19. Buhler V. Kollidon: Polyvinylpyrrolidone Excipients for the Pharmaceutical Industry. *Ludwigshafen: BASF*, 2008. 330 p.
20. Емшанова С. В. О контроле размера и формы частиц лекарственных веществ. *Химико-фармацевтический журнал*. 2007;41(1):41–49. DOI: 10.30906/0023-1134-2007-41-1-41-49.
21. Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б., Шохин И. Е., Новожиллов О. В., Мешковский А. П., Спицкий О. Р. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо, 2015. 472 с.
22. Shohin I. E., Grebenkin D. Yu., Malashenko E. A., Stanishevskii Ya. M., Ramenskaya G. V. A brief review of the FDA dissolution methods database. *Dissolution technologies*. 2016;23(3):6–10. DOI: 10.14227/DT230316P6.

REFERENCES

1. Reference on HIV infection in the Russian Federation as of June 30, 2020 (prepared at the Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS FBSI Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor). Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/07/Spravka-VICH-v-Rossii-1-polugodie-2020.pdf>. Accessed: 03.08.2020. (In Russ.).
2. Counteraction to HIV and other socially dangerous diseases: some indicators for 6 years. Government of the Russian Federation from 11.04.2018. Available at: <http://government.ru/info/32200/>. Accessed: 03.08.2020. (In Russ.).
3. Reference on HIV infection in the Russian Federation in 2019 (prepared at the Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS FBSI Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor). Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/02/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-na-31.12.2019.pdf>. Accessed: 03.08.2020. (In Russ.).
4. Prokofjeva M. M., Kochetkov S. N., Prassolov V. S. Therapy of HIV Infection: current approaches and prospects. *Acta Naturae*. 2016;8(4):26–36. DOI: 10.32607/20758251-2016-8-4-23-32. (In Russ.).
5. Ozerov A. A., Novikov M. S., Timofeeva Yu. A., Lobachev A. A., Luganchenko A. I., Heisman A. N. Pyrimidine non-nucleoside HIV-1 inhibitors: history of their development and perspectives. *Vestnik VolgSMU = Journal of VolgSMU*. 2012;3:10–17. (In Russ.).

6. Petrov V. I., Novikov M. S., Luganchenko A. I., Ozerov A. A., Rogova N. V. The cluster approach to the creation of biotech drugs. *Medicinskaya etika = Medical Ethics*. 2014;1:28–31. (In Russ.).
7. Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., Valuev-Elliston V. T., Temburnikar K., Ozerov A. A., Gurskaya G. V., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19:5794–5902. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
8. Ozerov A. A., Novikov M. S., Luganchenko A. I., Hartman T., Buckheit R. W. Novel N-[2-(benzoylphenoxy)ethyl] nucleic bases derivatives – synthesis and anti-HIV-1 activity *in vitro*. *Volgogradskij nauchno-meditsinskij zhurnal = Volgograd Journal of Medical Research*. 2012;4:15–18. (In Russ.).
9. Balasubramaniam D., Bee T. Influence of rapid disintegrants on the dissolution rate of solid oral dosage forms. *Farmaceuticheskaia otas'.* 2010;4(21):92–99. (In Russ.).
10. Demina N. B. Biopharmaceutical classification system as a tool for the development of drug formulations and their designs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2:56–60. (In Russ.).
11. Ganicheva L. M., Vdovina G. P. Biopharmaceutical aspects of development, production and administration of medicines. *Vestnik VolgSMU = Journal of VolgSMU*. 2012;3(43):3–9. (In Russ.).
12. Krasnuk (junior) I. I., Ovsyannikova L. V., Stepanova O. I., Belyatskaya A. V., Krasnuk I. I., Kharitonov Yu. Y., Grikh V. V., Kosheleva T. M., Korol L. A. Application of solid dispersions with non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmacy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;2:40–44. (In Russ.).
13. Huang Y., Dai W.-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014;4(1):18–25. DOI: 10.1016/j.apsb.2013.11.001.
14. Meng F., Gala U., Chauhan H. Classification of solid dispersions: correlation to (i) stability and solubility (ii) preparation and characterization techniques. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015;41(9):1401–1415. DOI: 10.3109/03639045.2015.1018274.
15. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavrukhin H. I., Bunyatyan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;2:52–59. (In Russ.).
16. Makarov V. G., Makarova M. N., Demchenko D. V. Methods for increasing solubility of medicinal agent based on pyrimidine derivative of benzophenone. Patent RU № 2729792. 12.08.2020.
17. Zhilyakova E. T., Agarina A. V., Novikova M. Yu., Ivanova L. L. Application of different thickener-prolongators of the kollidon grades in the pharmaceutical technology. *Nauchnyj rezul'tat. Seriya: Medicina i farmatsiya = Research Result. Series: Medicine and Pharmacy*. 2016;2(4):95–100. (In Russ.). DOI: 10.18413/2313-8955-2016-2-4-95-100.
18. Reintjes T. Solubility Enhancement with BASF Pharma Polymers Solubilizer Compendium. *Lampertheim: BASF*, 2011. 128 p.
19. Buhler V. Kollidon: Polyvinylpyrrolidone Excipients for the Pharmaceutical Industry. *Ludwigshafen: BASF*, 2008. 330 p.
20. Emshanova S.V. Drug particle shape and size control. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2007;41(1):41–49. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2007-41-1-41-49.
21. Bykovsky S. N., Vasilenko I. A., Diomina N. B., Shohin I. E., Novozhilov O. V., Meshkovsky A. P., Spitsky O. R. Pharmaceutical Development: Concept and Practical Guidelines. Scientific and practical guide for the pharmaceutical industry. Moscow: *Pero*, 2015. 472 p. (In Russ.).
22. Shohin I. E., Grebenkin D. Yu., Malashenko E. A., Stanishevskii Ya. M., Ramenskaya G. V. A brief review of the FDA dissolution methods database. *Dissolution technologies*. 2016;23(3):6–10. DOI: 10.14227/DT230316P6.



Оригинальная статья/Research article

Разработка термореверсивного стоматологического геля с берберинном

А. Г. Пальвинский^{1*}, Е. О. Бахрушина¹, Ж. М. Козлова¹, А. А. Сеницына², И. И. Краснюк¹

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Институт фармации им. А. П. Нелюбина, кафедра фармацевтической технологии, 105043, Россия, г. Москва, ул. 5-я Парковая, д. 21

2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Институт фармации им. А. П. Нелюбина, кафедра фармации, 125018, Россия, г. Москва, ул. Складочная, д. 1, стр. 17

*Контактное лицо: Пальвинский Артемий Германович. E-mail: aizenlock@gmail.com

ORCID: А. Г. Пальвинский – <https://orcid.org/0000-0003-0864-7565>; Е. О. Бахрушина – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Ж. М. Козлова – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>; А. А. Сеницына – <https://orcid.org/0000-0001-7023-8549>; И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 09.10.2020. Статья принята в печать: 12.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Одной из современных лекарственных форм с оптимальными биофармацевтическими свойствами для лечения и профилактики заболеваний полости рта является стоматологический гель. Перспективным действующим веществом с антибактериальным и противовоспалительным действием, способным образовывать устойчивые дисперсные системы с гелеобразующими компонентами, является изохинолиновый алкалоид берберин. Примечательно, что несмотря на выраженную противомикробную активность алкалоида берберина, в настоящее время на фармацевтическом рынке в обращении нет ни одной стоматологической лекарственной формы с данным компонентом, в связи с чем исследования в данном направлении представляют большой интерес.

Цель. Выбор оптимальной технологии получения стоматологического геля с берберинном для лечения заболеваний полости рта.

Материалы и методы. Берберина бисульфат (ЗАО «Вифитех», Оболенск, Московская область, РФ), полоксамеры P407 и P338 (EP, USP/N; BASF, Германия), пропиленгликоль (USP; BASF, Германия), натрия хлорид (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № S9888), муцин типа II из желудка свиньи (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № M2378). При разработке состава и технологии получения гелей использовали магнитную мешалку с функцией регулирования температурного режима (C-MAG HS 7 фирмы IKA, Германия). Гели готовили «горячим методом» и «холодным методом».

Результаты и обсуждение. Изготовление геля «горячим методом» обеспечило получение однородной лекарственной формы. Полученная величина pH укладывается в диапазон оптимальных значений. Измерение удельной силы отрыва модельного образца геля показало выраженные мукоадгезивные свойства, что указывает на отсутствие необходимости корректировки данного параметра путём введения дополнительных компонентов в рецептуру. Метод спектроскопии применим для анализа геля с берберинном. Установлено, что для разработки процедуры определения подлинности требуется значительное разведение стандартного образца субстанции.

Заключение. Изготовление образца лекарственной формы «горячим методом» является оптимальным, что, вероятно, связано с эффектом солюбилизации и лучшим распределением действующего вещества в основе.

Ключевые слова: берберин, полоксамеры, термореверсивные гели.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы А. Г. Пальвинский, Е. О. Бахрушина и И. И. Краснюк придумали, разработали и провели эксперимент. Авторы А. Г. Пальвинский и Е. О. Бахрушина участвовали в обработке данных. Авторы А. Г. Пальвинский, Ж. М. Козлова и А. А. Сеницына участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Авторы статьи благодарят за содействие в проведении эксперимента сотрудников фармацевтического предприятия ЗАО «Вифитех» (Оболенск, Московская область, РФ), а также выражают признательность компании BASF (Германия) за предоставленные образцы продукции для научного исследования.

Для цитирования: Пальвинский А. Г., Бахрушина Е. О., Козлова Ж. М., Сеницына А. А., Краснюк И. И. Разработка термореверсивного стоматологического геля с берберинном. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-88-92>

Development of Thermoreversible Dental Gel with Berberine

Artemiy G. Palvinskiy^{1*}, Elena O. Bakhrushina¹, Zhanna M. Kozlova¹, Anastasiia A. Sinitsyna², Ivan I. Krasnyuk¹

1 – I. M. Sechenov First MSUM of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University); Institute of Pharmacy named after A. P. Neliubin, Department of Pharmaceutical Technology, 21, 5-ya Parkovaya str., Moscow, 105043, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSUM of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University); Institute of Pharmacy named after A. P. Neliubin, Department of Pharmacy, 1/17, Skladochnaya str., Moscow, 125018, Russia

*Corresponding author: Artemiy G. Palvinskiy. E-mail: aizenlock@gmail.com

ORCID: Artemiy G. Palvinskiy – <https://orcid.org/0000-0003-0864-7565>; Elena O. Bakhrushina – <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>; Zhanna M. Kozlova – <https://orcid.org/0000-0003-1525-732X>; Anastasiia A. Sinitsyna – <https://orcid.org/0000-0001-7023-8549>; Ivan I. Krasnyuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 09.10.2020. Revised: 12.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Dental gel is one of the modern dosage forms with optimal biopharmaceutical properties for the treatment and prevention of oral diseases. An isoquinoline alkaloid berberine is the promising active substance with antibacterial and anti-inflammatory effect, capable of forming stable dispersed systems with gel-forming components. It is noteworthy that, despite the pronounced antimicrobial activity of the alkaloid berberine, there is currently no dental dosage form with this component on the pharmaceutical market, and therefore research in this direction is of great interest.

© Пальвинский А. Г., Бахрушина Е. О., Козлова Ж. М., Сеницына А. А., Краснюк И. И., 2020

© Palvinskiy A. G., Bakhrushina E. O., Kozlova Zh. M., Sinitsyna A. A., Krasnyuk I. I., 2020

Aim. Selection of the optimal technology for obtaining dental gel with berberine for the treatment of oral diseases.

Materials and methods. Berberine bisulfate (manufactured by CJSC «Vifitech», Obolensk, Moscow region, RF), poloxamers P407 and P338 (EP, USP/N; BASF, Germany), propylene glycol (USP; BASF, Germany), sodium chloride (Sigma-Aldrich, Germany, Cat. No. S9888), mucin type II from a pig stomach (Sigma-Aldrich, Germany, Cat. No. M2378). In the development of the composition and technology for the preparation of gels, a magnetic stirrer with a temperature control function (C-MAG HS 7 from IKA, Germany) was used. Gels were prepared by the «hot method» and «cold method».

Results and discussion. The production of the gel by the «hot method» provided a uniform dosage form. The obtained pH value is within the range of optimal diapason. Measurement of the specific peel force of the model gel sample showed pronounced mucoadhesive properties, which indicates that there is no need to adjust this parameter by introducing additional components into the formulation. The spectroscopic method is applicable for the analysis of berberine gel. It has been found that a significant dilution of the reference substance sample is required to develop an identification procedure.

Conclusion. The production of a sample of the dosage form by the «hot method» is optimal, which is probably due to the effect of solubilization and better distribution of the active substance in the base.

Keywords: berberine, poloxamers, thermoreversible gels.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Artemiy G. Palvinskiy, Elena O. Bakhrushina and Ivan I. Krasnyuk invented, designed, and ran an experiment. Authors Artemiy G. Palvinskiy and Elena O. Bakhrushina participated in data processing. Authors Artemiy G. Palvinskiy, Zhanna M. Kozlova and Anastasiia A. Sinitsyna contributed to the writing of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Acknowledgment. The authors of the article would like to thank the employees of the pharmaceutical enterprise CJSC «Vifitech» (Obolensk, Moscow region, RF) for their assistance in conducting the experiment, and also express their gratitude to the BASF company (Germany) for providing product samples for scientific research.

For citation: Palvinskiy A. G., Bakhrushina E. O., Kozlova Zh. M., Sinitsyna A. A., Krasnyuk I. I. Development of thermoreversible dental gel with berberine. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-88-92>

ВВЕДЕНИЕ

Дистрофические и воспалительные процессы тканей пародонта являются часто встречающимися патологическими процессами в стоматологической практике, возникающие зачастую в результате жизнедеятельности бактериальной и грибковой микрофлоры [1]. Заболевания пародонта представляют собой группу хронических воспалительных заболеваний, включая гингивит и периодонтит. К причинам развития заболеваний пародонта относят плохую гигиену полости рта, курение табака, прием лекарств, возраст, наследственность, реже диабет, гипертония, астма, заболевания печени [2]. Пародонтит является одним из самых распространенных воспалительных заболеваний у взрослых. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США, пародонтит считается всемирно распространенным заболеванием, вызывающим инвалидность, нарушения речи и снижение качества жизни [3].

Решение проблемы лечения заболеваний пародонта следует искать в подборе оптимальной схемы лечения [4], включающей в себя как необходимые хирургические манипуляции, так и вспомогательную фармакотерапию. Среди современных лекарственных форм с оптимальными биофармацевтическими свойствами одной из перспективных является стоматологический гель, в связи с чем представляет интерес для его дальнейшего изучения [5].

Одним из перспективных действующих веществ с антибактериальным и противовоспалительным эффектом, способным образовывать устойчивые дисперсные системы с гелеобразующими компонента-

ми является изохинолиновый алкалоид берберин [6]. Примечательно, что несмотря на выраженную противомикробную активность алкалоида берберина, в настоящее время на фармацевтическом рынке в обращении нет ни одной стоматологической лекарственной формы с данным компонентом, в связи с чем исследования в данном направлении представляют большой интерес.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве субстанции использовали берберина бисульфат (ЗАО «Вифитех», Оболенск, Московская область, РФ).

В ходе исследования были использованы современные вспомогательные вещества: полуксаммеры P407 и P338 (EP, USP/N; BASF, Германия), пропиленгликоль (USP; BASF, Германия), натрия хлорид (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № S9888), муцин типа II из желудка свиньи (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № M2378).

При разработке состава и технологии получения гелей использовали магнитную мешалку с функцией регулирования температурного режима (C-MAG HS 7 фирмы IKA, Германия).

Гели готовили следующими способами:

1. Изготовление геля «горячим методом».

Навеску субстанции берберина бисульфата массой 0,03 г смешивали в стеклянном химическом стакане с 5 мл (5,2 г) пропиленгликоля, отмеренного с помощью мерного цилиндра. Во второй химический стакан отмеряли 25 мл воды очищенной, помещали на магнитную мешалку и нагревали воду до 70 °С, поддерживая постоянную температуру. В воду постепен-

но при перемешивании добавляли навеску хлорида натрия массой 0,2 г до полного растворения. К полученному раствору постепенно, избегая комкования, добавляли сухую смесь навесок полоксамеров Р407 и Р338 в количестве 4,4 г и 4,0 г соответственно до образования однородной густой гелеобразной массы. К полученной массе постепенно добавляли смесь берберина и пропиленгликоля из первого химического стакана. Полученный гель перемешивали в течение 30 минут при температуре 70 °С, затем постепенно охлаждали до комнатной температуры.

2. Изготовление геля «холодным методом».

Мерным цилиндром отмеряли 25 мл воды очищенной, растворяли навеску натрия хлорида массой 0,2 г и переливали раствор в химический стакан. Полученный раствор охлаждали до 5 °С в холодильнике. В отдельном сухом химическом стакане смешивали между собой навески полоксамеров Р407 и Р338 массой 4,4 г и 4,0 г соответственно, и постепенно добавляли их к охлаждённому раствору натрия хлорида при перемешивании. Полученную смесь помещали в холодное (5 °С) защищённое от света место на 8 часов. За указанный период времени наблюдалось полное растворение компонентов смеси. Через 8 часов после охлаждения полученный вязкий текучий раствор доводили до комнатной температуры (15–25 °С) до получения однородной структуры геля. Навеску берберина бисульфата массой 0,03 г растворяли в 5 мл (5,2 г) пропиленгликоля и вводили в гель при перемешивании.

Оценка качества геля проводилась по следующим методикам:

1. **Измерение pH (ГФ РФ XIV, ОФС 1.2.1.0004.15; иономер Eutech pH 700, Thermo Scientific, Нидерланды).** Измерение pH проводилось для водных разведений гелей (2,0 г образца растворяли в 50 мл воды очищенной) в двух повторностях.
2. **Микроскопия (ГФ РФ XIV, ОФС 1.2.1.0003.15).** Образцы гелей были поочерёдно изучены под световым микроскопом при четырёхкратном увеличении.
3. **Оценка мукоадгезивных свойств.** Испытание проводилось путём измерения величины удельной силы отрыва (F') с применением рычажного механизма, представленного модифицированными плечевыми весами. С одной стороны весов на алюминиевой проволоке фиксировалась алюминиевая пластина размером 75 × 25 мм ($S = 18,75 \text{ см}^2$), накрытая слоем спанбонда с равномерно распределённым образцом геля. Толщина слоя геля составляла приблизительно 0,2 см. Пластины опускали на стеклянный предметный столик, также накрытый слоем спанбонда с равномерно распределённым 20 % водным раствором муцина (масс/об), и соединяли пластины друг с другом. На противоположную сторону весов помещали полную стеклянную ёмкость и постепенно наполняли её песком до тех пор, пока пластина с образцом геля не отрывалась от предметного столика. В момент отрыва фиксировалась масса стеклянной ёмкости с песком.

Удельную силу отрыва рассчитывали по формуле:

$$F' = (m \times g)/S,$$

где m – масса стеклянной ёмкости с песком, кг; g – ускорение свободного падения, 9,8 Н/кг (м/с²); S – площадь алюминиевой пластины, 18,75 см².

4. **Сопоставление максимумов поглощения аналитических образцов.** Анализ проводили спектрофотометрическим методом (УФ-спектрофотометр серии UV-1800, Shimadzu, Япония).

Навески вспомогательных веществ, модельного образца геля и субстанции берберина бисульфата переносили во флаконы из стекла объёмом 50 мл каждый, добавляли воду очищенную, укупоривали резиновыми пробками, помещали на орбитальный шейкер и перемешивали в течение 40 минут при скорости 70 об/мин до растворения содержимого. Полученные растворы отбирали мерной пипеткой и поочерёдно наполняли кювету для образцов до метки. В качестве холостого раствора использовалась вода очищенная. Спектрофотометрический анализ проводился в спектральном диапазоне 190–800 нм в двух повторностях для каждого аналитического образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке составов стоматологических гелей надлежащего качества одним из требований, предъявляемых к лекарственной форме, является выраженное свойство мукоадгезии [7]. Безусловно, соответствие геля перечисленным физико-химическим свойствам определяется составом используемой основы коллоидной системы. В качестве одних из перспективных гелеобразующих веществ были выбраны полоксамеры. Уникальным свойством гелей на основе полоксамеров является их термореверсивность (обратимое гелеобразование), проявляющееся в определённых диапазонах температур, и связанное с деагрегацией мицелл [8]. Явление обратимого гелеобразования представляет возможность получения гелей так называемыми «горячим» и «холодным» методами, что, в свою очередь, открывает новые возможности для изучения совместимости основ гелей с активными фармацевтическими субстанциями.

На основании вышеизложенного, образцы геля готовили «горячим» и «холодным» методами. Состав геля на упаковку: берберина бисульфат – 0,03 г; пропиленгликоль – 5,0 мл; натрия хлорид – 0,2 г; полоксамер Р407 – 4,4 г; полоксамер Р338 – 4,0 г; вода очищенная – 25,0 мл. Подбор компонентов геля и их количеств проводился эмпирически, основываясь на свойствах индивидуальных веществ.

Органолептически было определено, что гель, полученный «горячим» методом, умеренно липкий, не растекается и однороден, предположительно, за счёт введения в состав комбинации двух полоксамеров с разной молекулярной массой и добавления пропиленгликоля в качестве соразтворителя. Полоксамеры – поверхностно-активные вещества, в

связи с чем целесообразно включение в изучаемую рецептуру натрия хлорида, уменьшающего поверхностное натяжение растворов и предотвращающего обильное пенообразование в ходе технологического процесса.

При микроскопическом исследовании образцов в структуре геля, приготовленного «горячим методом», не наблюдались включения кристаллов берберина бисульфата по сравнению с гелем, полученным «холодным методом», что послужило критерием выбора образца для изучения мукоадгезивных свойств и дальнейшего исследования (рисунок 1).

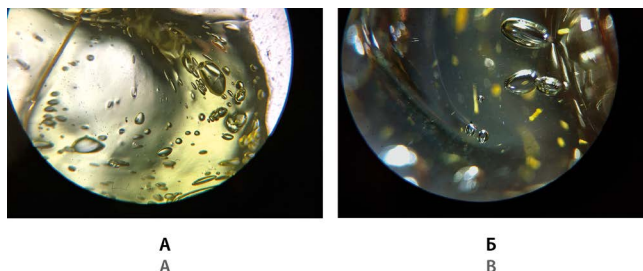


Рисунок 1. Микроскопия модельных образцов геля на основе полуксамеров

А – полученного «горячим методом»; **Б** – полученного «холодным методом»

Figure 1. Microscopy of model gel samples based on poloxamers
A – obtained by «hot method»; **B** – obtained by the «cold method»

Одним из важных критериев выбора лекарственных препаратов, применяемых при заболеваниях полости рта, следует рассматривать водородный показатель. По данным клинических исследований, оптимальное значение pH в полости рта у здорового человека находится в диапазоне 6,5–6,8 [9].

Значение pH водного извлечения геля, приготовленного «горячим методом», составило $6,67 \pm 0,10$.

В ходе эксперимента по оценке мукоадгезии было установлено, что масса наполненной стеклянной ёмкости с песком составила 1490 граммов. Таким образом, $F' = (1,49 \times 9,8)/18,75 = 0,78 \text{ Н/см}^2$.

В настоящее время мукоадгезия стоматологических гелей не нормируется ни одной фармакопеей в мире. Однако полученные значения массы груза и величины силы отрыва пластины от поверхности позволяют субъективно оценить мукоадгезивные свойства модельного образца как выраженные.

При изучении совместимости берберина бисульфата с полуксамирами и оценке возможности применения спектральных методов для установления подлинности и количественного анализа субстанции в лекарственной форме были подготовлены аналитические образцы: водные растворы берберина бисульфата, полуксамеров, натрия хлорида, готового геля, а также пропиленгликоль без разведения водой очищенный (таблица 1).

В результате исследования установлено, что для аналитических образцов 1, 2, 5 и 6 не обнаруживаются характерные полосы поглощения. Для образцов 3 и 4 были получены схожие спектры, причём для образца 4 потребовалось дополнительное разведение в 250 раз для получения спектра с корректным распределением полос поглощения. В указанных областях спектра наблюдалось совпадение положений максимумов для образцов, содержащих берберин (рисунок 2). Таким образом, вспомогательные вещества в составе геля не вносят вклад в спектры поглощения представленного изохинолинового алкалоида. Использование метода спектроскопии в УФ и видимой областях возможно для определения подлинности и количественного анализа действующего вещества в лекарственной форме. Значения максимумов поглощений представлены в таблице 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований было установлено, что при изготовлении гелей на основе полуксамеров Р407 и Р338 совместно с действующим веществом берберина бисульфатом предпочтительным является «горячий метод» получения по сравнению с «холодным методом», поскольку в коллоидной системе наблюдается более равномерное распределение действующего вещества, что, вероятно, связа-

Таблица 1. Состав и параметры аналитических образцов, подготовленных для спектрофотометрического анализа

Table 1. Composition and parameters of analytical samples, prepared for spectrophotometric analysis

№	Название растворённого компонента Name of dissolved component	Масса навески компонента для получения аналитического образца, граммы Weighted amount of component for obtaining an analytical sample, grams	Объём воды очищенной для получения аналитического образца, мл Volume of purified water to obtain an analytical sample, ml	Массо-объёмная доля растворённого компонента, % Weight/volume percent of dissolved component, %
1	Полуксамер Р338	0,1202	35	~0,34
2	Полуксамер Р407	0,1204	35	~0,34
3	Гель, полученный «горячим методом»	0,1515	35	~0,43
4	Берберина бисульфат (без разведения)	0,1200	40	0,3
5	Пропиленгликоль (без разведения)	5,2114	Не применимо	Не применимо
6	Натрия хлорид	0,3511	35	~1,0

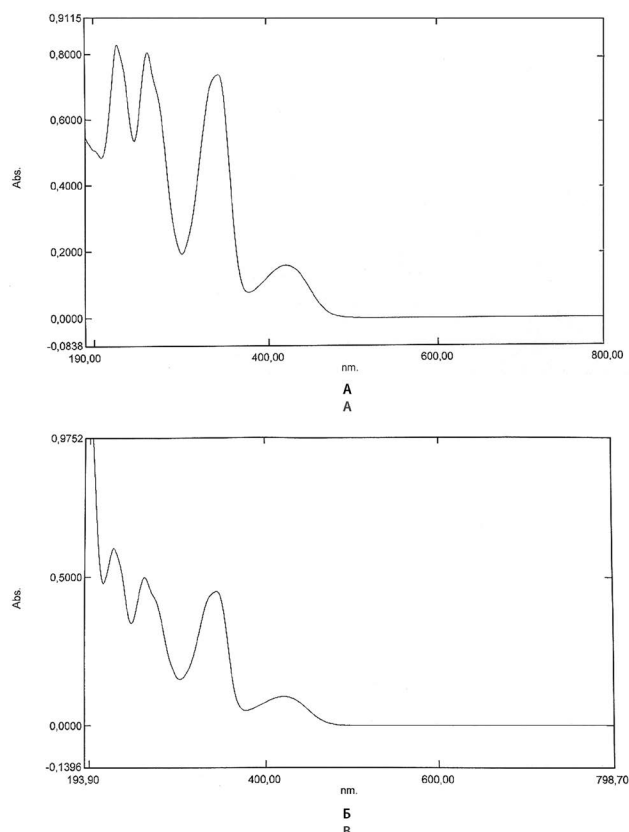


Рисунок 2. Спектры поглощения аналитических образцов
А – содержащего навеску берберина бисульфата; Б – содержащего навеску геля, полученного «горячим методом»

Figure 2. Absorption spectra of analytical samples

А – containing a sample of berberine bisulfate; В – containing a sample of the gel obtained by the «hot method»

но с проявлением эффекта солюбилизации. Изучение аналитических образцов методом спектроскопии позволило определить и соотнести характерные полосы поглощения и длины волн для активной фармацевтической субстанции в чистом виде и в составе геля, что указывает на пригодность метода для его дальнейшего применения в нормировании лекарственной формы по показателям «подлинность» и «количественное определение».

Таблица 2. Значения характерных максимумов поглощения для аналитических образцов, содержащих берберина бисульфат

Table 2. Values of characteristic absorption maxima for analytical samples containing berberine bisulfate

Значение длины волны, нм Wavelength, nm	Область спектра Region of spectrum
420 ± 1	Видимая Visible
345 ± 1	УФ UV
263 ± 1	УФ UV
227 ± 1	УФ UV

ЛИТЕРАТУРА

1. Ролик С. Н., Печенежская Л. А., Баглык Т. В., Соколова И. И., Герман С. И. Разработка и исследование стоматологического геля. *Украинский стоматологический альманах*. 2011;3:58–60.
2. Nazir M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72–80.
3. Копецкий И. С., Побожьева Л. В., Шевелюк Ю. В. Взаимосвязь воспалительных заболеваний пародонта и общесоматических заболеваний. *Лечебное дело*. 2019;2:7–12. DOI: 10.24411/2071-5315-2019-12106.
4. Качесова Е. С., Шевченко Е. А., Успенская О. А. Новая схема комплексного лечения агрессивных форм пародонтита. *Современные технологии в медицине*. 2017;9(4):209–216. DOI: 10.17691/stm2017.9.4.26.
5. Сампиев А. М., Беспалова А. В., Никифорова Е. Б. Биофармацевтические исследования по выявлению оптимального состава стоматологического геля с тримекаином. *Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке*. 2016;18(9):107–111.
6. Chu M., Xiao R.-X., Yin Y.-N., Wang X., Chu Z.-Y., Zhang M.-B., Ding R., Wang Y.-D. Berberine: A Medicinal Compound for the Treatment of Bacterial Infections. *Clinical Microbiology: Open Access*. 2014;3(3): 132–158. DOI: 10.4172/2327-5073.1000150.
7. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Барнолицкий Г. Г., Кречетов С. П. Обоснование реологических оптимумов при разработке мягких лекарственных форм на гидрофильной основе. *Стоматологические гели. Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2(19):124–128.
8. Бахрушина Е. О., Никифорова Д. А., Демина Н. Б. Основные аспекты разработки терморевверсивных поликомплексов поллоксамеров. *Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке*. 2018;20(5):103–106.
9. Ediriweera D. S., Dilina N., Saparamadu V., Fernando I., Kurukulasuriya B., Fernando D., Kurera J. Aspirin is associated with low oral pH levels and antacid helps to increase oral pH. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):137. DOI: 10.1186/s13104-018-3247-3.

REFERENCES

1. Rolik S. N., Pechenezhskaia L. A., Baglyk T. V., Sokolova I. I., German S. I. Development and research of dental gel. *Ukrains'kij stomatologichnij al'manah*. 2011;3:58–60. (In Ukraine).
2. Nazir M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72–80.
3. Kopetskiy I. S., Pobozhieva L. V., Sheveluk Yu. V. Correlation between Periodontitis and Systemic Diseases. *Lechebnoye delo*. 2019;2:7–12. (In Russ.). DOI: 10.24411/2071-5315-2019-12106.
4. Kachesova E. S., Shevchenko E. A., Uspenskaya O. A. A New Regimen of Complex Therapy for Aggressive Periodontitis. *Sovremennye tekhnologii v medicine = Modern Technologies in Medicine*. 2017;9(4):209–216. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2017.9.4.26.
5. Sampiev A. M., Bepalova A. V., Nikiforova E. B. Biopharmaceutical Study To Identify The Optimal Composition Dental Gel With Trimekain. *Zhurnal nauchnyh statej Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = The journal of scientific articles Health & Education in millennium*. 2016;18(9):107–111. (In Russ.).
6. Chu M., Xiao R.-X., Yin Y.-N., Wang X., Chu Z.-Y., Zhang M.-B., Ding R., Wang Y.-D. Berberine: A Medicinal Compound for the Treatment of Bacterial Infections. *Clinical Microbiology: Open Access*. 2014;3(3): 132–158. DOI: 10.4172/2327-5073.1000150.
7. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Barnolitskiy G. G., Krechetov S. P. Justification of the rheological optimum in the development of semisolid forms. Dental gels. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2(19):124–128. (In Russ.).
8. Bakhrushina E. O., Nikiforova D. A., Demina N. B. The main aspects of the thermoreversible polycomplexes of poloxamers developing. *Zhurnal nauchnyh statej Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = The journal of scientific articles Health & Education in millennium*. 2018;20(5):103–106. (In Russ.).
9. Ediriweera D. S., Dilina N., Saparamadu V., Fernando I., Kurukulasuriya B., Fernando D., Kurera J. Aspirin is associated with low oral pH levels and antacid helps to increase oral pH. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):137. DOI: 10.1186/s13104-018-3247-3.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>
УДК 615.074; 615.322



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме

Е. В. Игнатьева^{1*}, И. В. Ярцева¹, З. С. Шпрах^{1,2}, И. Р. Просалкова¹, С. А. Сасов¹, О. Л. Орлова¹

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

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

*Контактное лицо: Игнатьева Елена Владимировна. E-mail: chem_analysis@ronc.ru

ORCID: Е. В. Игнатьева – <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>; И. В. Ярцева – <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>; З. С. Шпрах – <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>;

И. Р. Просалкова – <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>; С. А. Сасов – <https://orcid.org/0000-0002-9679-6263>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Статья поступила: 09.06.2020. Статья принята в печать: 07.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Количественное определение действующего вещества является необходимой и едва ли не самой значимой частью контроля качества лекарственного средства. Выполнение высоких требований, предъявляемых к аналитическим методикам количественного определения, гарантирует валидация используемых методик. Представленная работа посвящена разработке и валидации методики количественного определения действующего вещества методом спектрофотометрии в лекарственной форме отечественного противоопухолевого и антиангиогенного лекарственного средства «Димерный макроциклический танин (ДМТ) лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения основного вещества для стандартизации препарата «ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Материалы и методы. В работе использованы «ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» и ДМТ, активная фармацевтическая субстанция. Метод исследования: спектрофотометрия.

Результаты и обсуждение. Разработана методика количественного определения действующего вещества в лиофилизированной лекарственной форме ДМТ методом прямой УФ-спектрофотометрии. Определены валидационные характеристики разработанной методики.

Заключение. Результаты валидации показали, что методика количественного определения ДМТ в лекарственной форме обеспечена приемлемой правильностью, прецизионностью и линейностью. Полученные результаты соответствуют принятым критериям, что позволяет использовать разработанную методику для оценки качества лекарственного средства.

Ключевые слова: димерный макроциклический танин (ДМТ), стандартизация, количественный анализ, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Шпрах З. С., Просалкова И. Р., Сасов С. А., Орлова О. Л. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>

Development and Validation of Dimeric Macrocyclic Tannin Assay Method in Dosage Forms

Elena V. Ignateva^{1*}, Irina V. Yartseva¹, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Irina R. Prosalkova¹, Sergei A. Sasov¹, Olga V. Orlova¹

1 – Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 24, Kashirskoye sh., 115478, Moscow, Russia

2 – 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: Elena V. Ignateva. E-mail: chem_analysis@ronc.ru

ORCID: Elena V. Ignateva – <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>; Irina V. Yartseva – <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>; Zoya S. Shprakh – <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>;

Irina R. Prosalkova – <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>; Sergei A. Sasov – <https://orcid.org/0000-0002-9679-6263>; Olga V. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Received: 09.06.2020. Revised: 07.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Quantitative assessment of the active substance is necessary and perhaps the most significant part of the drug quality control. Validation of the analytical methods of quantitative assessment ensures their compliance with high requirements. The present study describes the development and validation of a spectrophotometry method for the quantitative evaluation of the active substance in the drug form of the national antitumor and antiangiogenic drug «Dimeric macrocyclic tannin (DMT) lyophilizate for solution for injection, 100 mg».

Aim. The development and validation of the assay method for the standardization of «DMT lyophilizate for solution for injection, 100 mg».

Materials and methods. The study used «DMT lyophilizate for solution for injection, 100 mg» and the active substance DMT. Method – spectrophotometry.

Results and discussion. The method of the quantitative assessment of the active substance in the DMT lyophilized drug by direct UV spectrophotometry was developed and the validation characteristics of the method were defined as a result of the study.

Conclusion. The validation results showed that the assay method of DMT in the drug form has the appropriate accuracy, precision and linearity. The obtained results correspond to the approved criteria that allow the use of the developed methodology for evaluating the quality of the drug.

© Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Шпрах З. С., Просалкова И. Р., Сасов С. А., Орлова О. Л., 2020

© Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Prosalkova I. R., Sasov S. A., Orlova O. V., 2020

Keywords: dimeric macrocyclic tannin (DMT), standardization, assay, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Prosalkova I. R., Sasov S. A., Orlova O. V. Development and validation of dimeric macrocyclic tannin assay method in dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>

ВВЕДЕНИЕ

Изучение представителей класса гидролизуемых таннинов в качестве потенциальных противовирусных, иммуномодулирующих и противоопухолевых средств насчитывает не одно десятилетие. Это объясняется большим разнообразием потенциальных механизмов биологической активности соединений данного класса. Среди таких механизмов – *антиангиогенное и антивазкулярное действия*, которые проявляются подавлением развития сосудистой сети опухоли и уничтожением уже сформированных опухолевых микрососудов соответственно [1–3].

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России из соцветий и побегов кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) (Иван-чая) выделен комплекс гидролизуемых макроциклических таннинов. Основной частью этого комплекса (около 90 %) является димерный макроциклический таннин (ДМТ), который в эксперименте проявил значительную противоопухолевую и антиангиогенную активность. Лекарственная форма (ЛФ) ДМТ представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, не содержащий вспомогательных веществ [4–6].

Качество лекарственного средства обеспечивает стандартностью как активного вещества, так и лекарственных форм на их основе. Одним из наиболее важных разделов контроля качества и стандартизации лекарственного средства является количественное определение действующего вещества. К аналитическим методикам, используемых для определения этого параметра, предъявляются высокие требования: они должны отличаться высокой достоверностью, точностью и, желательно, простотой исполнения. Правильность и точность результатов методик количественного определения гарантируется их валидацией, что особенно важно для стандартизации фармацевтических препаратов [7–9].

Цель данного исследования – разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества в лекарственной форме димерного макроциклического таннина, представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы. ДМТ, фармацевтическая субстанция (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России); ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России).

Приборы и аппаратура. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); мерная посуда 1-го класса точности.

Методика (метод спектрофотометрии)

Для приготовления *испытуемого раствора* содержимое флакона растворяли в воде очищенной, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали; 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали.

Для приготовления *раствора стандартного образца (СО)* около 100 мг (точная навеска) субстанции ДМТ растворяли в воде очищенной, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и готовили раствор в том же разведении, что и испытуемый раствор.

Измерение оптической плотности полученных растворов проводили относительно воды в максимуме при длине волны 265 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание ДМТ (X , мг) во флаконе вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot C}{A_0 \cdot 100},$$

где A_1 и A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора и раствора СО соответственно; a_0 – навеска СО ДМТ, мг; P – содержание ДМТ в СО, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макроциклические таннины кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub принадлежат к классу эллаготаннинов, которые представляют со-

бой сложные эфиры эллаговой и родственных ей гидроксифенилкарбоновых кислот с глюкозой [3]. Ароматические циклы, входящие в состав молекулы ДМТ, ответственны за поглощение излучения в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Это позволяет использовать спектрофотометрию для количественного определения основного вещества в ЛФ.

Электронные спектры поглощения водных растворов субстанции и лекарственной формы ДМТ содержат максимумы поглощения при длинах волн 215 ± 2 нм, 265 ± 2 нм и их спектральные характеристики полностью совпадают (рисунки 1 и 2). В качестве аналитического выбран максимум поглощения при длине волны 265 нм, поскольку в коротковолновой области спектра сильнее проявляются искажения из-за немонахроматичности излучения [10].

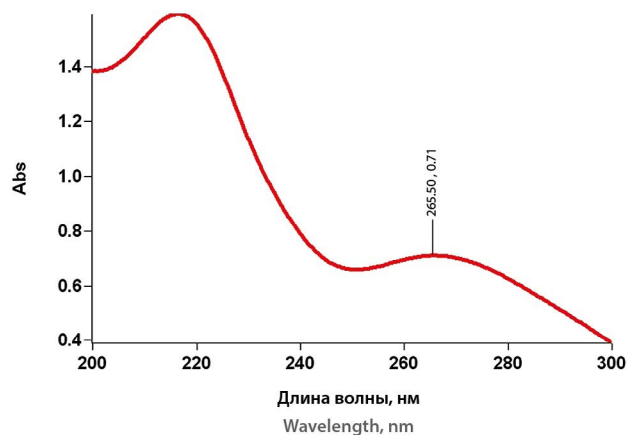


Рисунок 1. Электронный спектр поглощения водного раствора субстанции димерного макроциклического танина

Figure 1. Electronic spectrum of absorption of dimeric macrocyclic tannin substance water solution

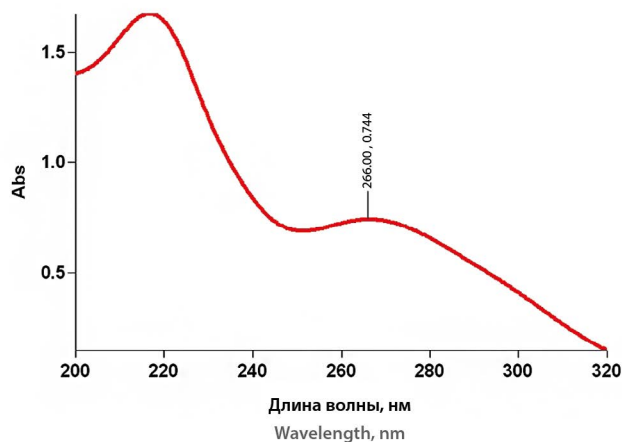


Рисунок 2. Электронный спектр поглощения водного раствора лекарственной формы димерного макроциклического танина

Figure 2. Electronic spectrum of absorption of dimeric macrocyclic tannin dosage form water solution

Интенсивность поглощения ДМТ в водных растворах в максимуме при 265 нм зависит от их концентрации, и нами было показано, что в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,03 мг/мл эта зависимость имеет линейный характер, т. е. в данном максимуме поглощения соблюдается закон Бугера – Ламберта – Бера (рисунок 3).

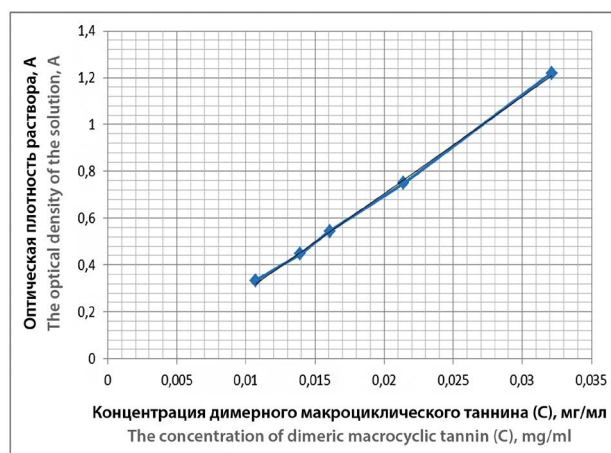


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности от концентрации водного раствора димерного макроциклического танина

Figure 3. The dependence of the optical density on the concentration of the water solution of dimeric macrocyclic tannin

Рабочей концентрацией раствора ДМТ была выбрана концентрация 0,02 мг/мл, при которой величина оптической плотности укладывается в интервал от 0,2 до 0,8, рекомендованный Государственной фармакопеей. В состав ЛФ ДМТ не входят вспомогательные вещества и, как видно из рисунков 1 и 2, спектры субстанции и ЛФ ДМТ близких концентраций совпадают, поэтому в качестве раствора сравнения при проведении анализа использована вода. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении действующего вещества в методику введен способ расчета по стандартному образцу. В качестве СО использовали субстанцию ДМТ с точно установленным содержанием активного вещества. Разработанная методика приведена в разделе «Материалы и методы».

Поскольку предложенная методика будет использоваться для количественного определения основного вещества при стандартизации и контроле качества лекарственного средства, она подлежит валидации. В соответствии с требованиями ГФ XIV издания для подобных аналитических методик определяются следующие валидационные характеристики: специфичность, аналитическая область (диапазон применения), линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность) [7, 11, 12].

Специфичность методики обусловлена отсутствием в ЛФ ДМТ вспомогательных веществ, которые могли бы влиять на спектральные характеристики (положение и величину аналитического сигнала), что подтверждается идентичностью ЭСП субстанции и ЛФ (см. рисунки 1 и 2).

В соответствии с требованиями ГФ XIV издания методика количественного определения должна быть применима в интервале от 80 до 120 % от номинального содержания действующего вещества в единице лекарственного средства (диапазон применения методики). В указанном интервале результаты, получаемые с использованием данной методики, имели приемлемый уровень линейности, правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

Линейность предложенной методики проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (оптической плотности) для проб с различным содержанием ДМТ в пределах аналитической области методики от 80 до 120 % от номинального содержания ДМТ во флаконе в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,024 мг/мл. На каждом уровне проводили по 3 определения и рассчитывали среднее значение оптической плотности.

Анализ полученных экспериментальных данных, приведенных в таблице 1, показывает, что рассчитанный коэффициент корреляции r равный 0,99915 отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$. Это свидетельствует о наличии тесной линейной зависимости между концентрацией ДМТ и величиной оптической плотности в аналитической области методики. Результаты проведенных экспериментов хорошо описываются уравнением $y = 37,37 \cdot x - 0,005$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин является графическое изображение регрессионной прямой (рисунок 4).

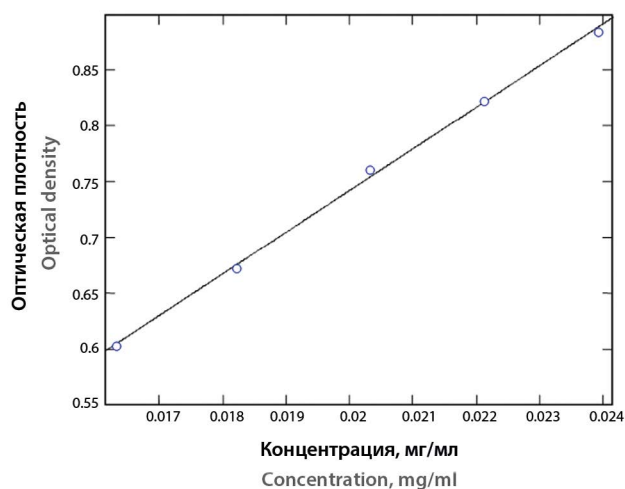


Рисунок 4. Графическое изображение регрессионной прямой
Figure 4. Graphical representation of the regression line

Таблица 1. Определение параметров линейной зависимости

Table 1. Determination of parameters of linear dependence

Процент от номинального содержания Percentage of nominal content	Концентрация ДМТ, мг/мл DMT concentration, mg/ml	Оптическая плотность Optical density	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$ Linear dependency parameters $y = bx + a$
80 %	0,0163	0,603	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 37,37$ Linear slope $b = 37,37$
90 %	0,0182	0,672	Свободный член линейной зависимости $a = -0,005$ Free term of linear dependence $a = -0,005$
100 %	0,0203	0,761	Коэффициент корреляции $r = 0,99915$ Correlation coefficient $r = 0,99915$
110 %	0,0221	0,823	
120 %	0,0239	0,884	$y = 37,37 \cdot x - 0,005$

Для подтверждения правильности аналитической методики проводили анализ навесок ЛФ ДМТ в диапазоне от 80 до 120 % от номинального содержания основного действующего вещества в препарате. Приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2,0 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. На каждом уровне проводили 3 определения. Результаты анализа оценивали путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением. Данные исследования приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики

Table 2. The results of evaluating the correctness of the methodology

№ п/п № p/p	Содержание ДМТ в анализируемой пробе ЛФ, мг DMT content in the analyzed Lf sample, mg	Найдено Found	
		мг mg	%
1	81,6	82,16	100,68
2	80,9	80,93	100,03
3	102,0	106,41	104,30
4	101,3	104,09	102,75
5	120,6	122,60	101,66
6	119,7	119,36	99,71

На основании данных, представленных в таблице 3, спектрофотометрическая методика может быть признана правильной, так как относительная ошибка среднего результата ($\bar{\varepsilon} = 1,82 \%$) не превышает 2 %; полученные результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $101,52 \pm 1,85$, и приближаются к истинному значению. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа, составило $t = 2,12$, что ниже табличного значения коэффициента

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Table 3. Metrological characteristics of the average analysis result

№	<i>m</i>	<i>f</i>	$\bar{X}$, %	S^2	<i>S</i>	$S_{\bar{x}}$	S_r , %	<i>P</i> , %	$t(p, f)$ табл. $t(p, f)$ tab.	$t(p, f)$ выч. $t(p, f)$ calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
1	6	5	101,52	3,09254	1,75856	0,71793	0,71	95	2,57	2,12	1,85	1,82

ента Стьюдента, который при степени свободы $f = 5$ и доверительной вероятности 95 % равен 2,57, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Таким образом, результаты, полученные данным методом, являются правильными и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность исследовали на однородных образцах как повторяемость (сходимость) и промежуточную (внутрилабораторная) прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов образцов в двух сериях, отличающихся временем выпуска. Измерения проводили в одинаковых условиях с использованием одного и того же прибора, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени. Для двух серий выполнено по 6 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Результаты оценки сходимости методики

Table 4. The results of the convergence assessment of the methodology

№ п/п № p/p	Найдено во флаконе, мг Found in vial, mg	
	Серия 1 Series 1	Серия 2 Series 2
1	100,17	107,31
2	101,79	107,56
3	103,30	108,94
4	101,92	106,68
5	102,67	109,69
6	102,93	107,94

Среднее значение содержания ДМТ ($\bar{x}$, мг) в сериях 1 и 2 лекарственной формы равно 102,13 мг и 108,02 мг соответственно. При сравнении табличного значения коэффициента Стьюдента $t_{\text{табл.}}$ (95 %, 5) = 2,57 и рассчитанных $t(p, f) = 2,47$ и 2,25 по результатам анализа двух выборок обнаружено, что $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Отно-

сительное стандартное отклонение измеряемой величины (S_r) составляет для серии 1 – 0,45 %; для серии 2 – 0,35 %.

При исследовании внутрилабораторной прецизионности анализ производили два сотрудника в разные дни. Результаты исследования приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Результаты оценки промежуточной прецизионности

Table 6. The results of evaluating the intermediate precision

Серия ЛФ Dosage Form Series	№ п/п № p/p	Найдено ДМТ во флаконе, мг Found DMT in a vial, mg	
		Исследователь 1 Explorer 1	Исследователь 2 Explorer 2
Серия 1 Series 1	1	100,17	103,30
	2	101,79	104,81
	3	103,30	101,29
	4	101,92	102,67
	5	102,67	101,67
	6	102,93	100,54

При сравнении результатов, полученных двумя сотрудниками, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го исследователей незначительны. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа двух выборок, составило $t(p, f) = 2,47$ и 2,19. Табличное значение коэффициента Стьюдента – $t_{\text{табл.}}$ (95 %, 5) = 2,57, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Относительное стандартное отклонение измеряемой величины (S_r) составляет для 1 исследователя – 0,45 %; для 2 исследователя – 0,62 %. Таким образом, показано, что рассеяние результатов, получаемых с использованием разработанной методики относительно среднего результата, незначительно, т. е. данная методика анализа отвечает критерию прецизионности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана спектрофотометрическая методика количественного определения действующего вещества для

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Table 5. Metrological characteristics of the average analysis result

№ серии No. Series	<i>m</i>	<i>f</i>	$\bar{X}$, мг $\bar{X}$, mg	S^2	<i>S</i>	$S_{\bar{x}}$	S_r , %	<i>P</i> , %	$t(p, f)$ табл. $t(p, f)$ tab.	$t(p, f)$ выч. $t(p, f)$ calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
Серия 1 Series 1	6	5	102,13	1,20604	1,11266	0,45832	0,45	95	2,57	2,47	1,18	1,15
Серия 2 Series 2	6	5	108,02	1,23060	1,10932	0,45288	0,35	95	2,57	2,25	1,16	1,08

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата

Table 7. Metrological characteristics of the average result

Исследователь Researcher	m	f	$\bar{X}$, мг $\bar{X}$, mg	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	S_r , %	P, %	t(p, f) табл. t(p, f) tab.	t(p, f) выч. t(p, f) calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
1	6	5	102,13	1,20604	1,11266	0,45832	0,45	95	2,57	2,47	1,18	1,15
2	6	5	102,38	2,38264	1,54358	0,63016	0,62	95	2,57	2,19	1,62	1,58

контроля содержания ДМТ в единице ЛФ. Валидация подтвердила линейную зависимость величины аналитического сигнала от концентрации изучаемого вещества в растворе, а также показала, что данная методика в исследованном аналитическом диапазоне от 80 до 120 % от номинального содержания основного действующего вещества в единице ЛФ обеспечена приемлемой правильностью и прецизионностью. Полученные результаты соответствуют критериям, рекомендуемым Государственной фармакопеей, и не отягощены систематической ошибкой. Использование данной методики позволяет достоверно установить содержание комплекса гидролизуемых танинов в лекарственной форме и корректно контролировать качество лиофилизированного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соломко Э. Ш., Степанова Е. В., Абрамов М. Е., Барышников А. Ю., Личиницер М. Р. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;9(4):3–10.
2. Соломко Э. Ш., Степанова Е. В., Григорьева И. Н., Барышников А. Ю. Оценка антиангиогенной активности экстрактов растений и их фракций, произрастающих на территории России. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(2):56.
3. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Ярцева И. В., Толкачев О. Н. Макроциклические танины кипрея узколистного. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010;10:24–29.
4. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Алиева Т. А., Бедрина Е. Н., Толкачев О. Н., Мисюрин В. А., Кесаева Л. А., Финашутин Ю. П., Лыжко Н. А., Мисюрин А. В., Масляков В. Ю., Фадеев Н. Б. Гидролизующие галлоэллаго-танины кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium* (L.)) из биосборки питомника ботанического сада фгбн вилар – перспективный источник для получения цитотоксических средств. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;1:28–34. DOI: 10.29296/25877313-2019-01-04.
5. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Решетникова В. В., Личиницер М. Р., Степанова Е. В., Хоченков Д. А., Оборотова Н. А., Орлова О. Л., Игнатьева Е. В., Ярцева И. В. Антиангиогенное лекарственное средство. Патент РФ № 2634253; 2017.10.24.
6. Шпрах З. С., Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Сасов С. А., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Хоченков Д. А., Королев А. М., Малютин Н. М. Стандартизация лиофилизированной лекарственной формы димерного макроциклического танина. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(4):68–72. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. ОФС.1.1.0012.15; ОФС.1.1.0013.15. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018. 1814 с.
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Доступно по: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
9. Береговых В. В., Ишмухаметов А. А., Пятигорская Н. В., Алдышева Ж. И. Валидация в производстве лекарственных средств. М.: Ремедиум. 2019. 328 с.
10. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. Л.: Химия. 1986. 432 с.

11. Шпрах З. С., Игнатьева Е. В., Ярцева И. В. Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):57–62. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62.
12. Шпрах З. С., Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Дмитричева Н. А., Смирнова Л. И. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(3):55–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61.

REFERENCES

1. Solomko E. Sh., Stepanova E. V., Abramov M. E., Baryshnikov A. Yu., Lichinitser M. R. Angiogenesis inhibitors from plants origin: perspective for clinical usage. *Rossisky bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2010;9(4):3–10. (In Russ.).
2. Solomko E. Sh., Stepanova E. V., Grigorieva I. N., Baryshnikov A. Yu. Evaluation of the antiangiogenic activity of herbal extracts and fractions of plants growing in Russia. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(2):56. (In Russ.).
3. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Yartseva I. V., Tolkachev O. N. Macrocyclic tannins of chamaenerion angustifolium. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2010;10:24–29 (In Russ.).
4. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Totoeva N. N., Alieva I. A., Bedrina E. N., Tolkachev O. N., Misyurin V. A., Kesaeva L. A., Finashutina Yu. P., Lyzhko N. A., Misyurin A. V., Maslyakov V. Yu., Fadeev N. B. Hydrolyzable gallo-ellago-tannins of *Chamaenerion angustifolium* (L.) of the biocollection of the Vilar State University Botanical garden are a promising source for cytotoxic agents. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2019;1:28–34. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2019-01-04.
5. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Reshetnikova V. V., Lichinitser M. R., Stepanova E. V., Hochenkov D. A., Oborotova N. A., Orlova O. L., Ignateva E. V., Yartseva I. V. Anti-angiogenic drug. Patent RF on the invention № 2634253; 2017.10.24. (In Russ.).
6. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V., Sasov S. A., Orlov O. V., Polozkova A. P., Hochenkov D. A., Korolev A. M., Malutina N. M. Standardization of lyophilized dosage form of dimeric macrocyclic tannin. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(4):68–72. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73.
7. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. OFS.1.1.0012.15; OFS.1.1.0013.15. Moscow: FEMB. 2018. 1814 p. (In Russ.).
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
9. Beregovykh V. V., Ishmukhametov A. A., Pyatigorskaya N. V., Aladysheva Zh. I. Validation in the drug manufacturing. Moscow: Remedium. 2019. 328 p. (In Russ.).
10. Bulatov M. I., Kalinkin I. P. Practical Guide of photometric analysis methods. 5th ed. Leningrad: Chemistry. 1986. 432 p. (In Russ.).
11. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V. Development and validation of aranos assay in the dosage form. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):57–62. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62.
12. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V., Dmitricheva N. A., Smirnova L. I. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossisky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016; 15(3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-99-106>
УДК 615.453.82



Оригинальная статья/Research article

Разработка и стандартизация карандашей лекарственных с эвкалимином

К. Ю. Алешникова^{1*}, В. Н. Дул¹, М. А. Джавахян¹, О. А. Семкина¹

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

*Контактное лицо: Алешникова Кристина Юрьевна. E-mail: k.aleshnikova@yandex.ru

ORCID: К. Ю. Алешникова – <https://orcid.org/0000-0003-3241-7225>; В. Н. Дул – <https://orcid.org/0000-0001-7824-4417>; М. А. Джавахян – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; О. А. Семкина – <https://orcid.org/0000-0002-2611-4490>.

Статья поступила: 06.07.2020. Статья принята в печать: 21.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Перспективными источниками получения лекарственных препаратов противовоспалительного действия, представляющими интерес для практической медицины, являются субстанции растительного происхождения. Эвкалимин, выделенный из листьев или побегов эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labil) семейства миртовые (*Myrtaceae*). Субстанция представляет собой очищенную сумму терпеноидных фенолоальдегидов флороглюцинового ряда (эуглобелей) и тритерпеноидов.

Цель. Создание карандашей лекарственных с эвкалимином для профилактики и лечения воспалительных заболеваний кожи.

Материалы и методы. Объект исследования эвкалимин. Проведено изучение формы и размера частиц экалина и его распределение в различных дисперсионных средах: цетиловый спирт, стеариловый спирт, воск эмульсионный, масло касторовое, масло персиковое, вазелин медицинский.

Результаты и обсуждение. В статье представлены результаты экспериментальных исследований обоснования выбора вспомогательных веществ для карандашей лекарственных и их стандартизация.

Заключение. Разработан состав и технология карандашей лекарственных с эвкалимином для наружного применения, установлены показатели качества.

Ключевые слова: эвкалимин, карандаши лекарственные, технология получения, спектрофотометрический анализ, тонкослойная хроматография.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы К. Ю. Алешникова, М. А. Джавахян разработали состав карандашей лекарственных, обосновали выбор вспомогательных веществ, провели анализ и систематизацию полученных данных. Авторы К. Ю. Алешникова, В. Н. Дул, М. А. Джавахян провели стандартизацию карандашей лекарственных, определение действующих веществ. Авторы В. Н. Дул, М. А. Джавахян, О. А. Семкина оказывали консультационную помощь в проведении эксперимента. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, написании и оформлении статьи и теоретических расчетах.

Для цитирования: Алешникова К. Ю., Дул В. Н., Джавахян М. А., Семкина О. А. Разработка и стандартизация карандашей лекарственных с эвкалимином. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-99-106>

Development and Standardization of Crayons with Eucalimine

Kristina Yu. Aleshnikova^{1*}, Vyacheslav N. Dul¹, Marina A. Dzhevakhyan¹, Olga A. Semkina¹

¹ – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Russia, 7/1, Green str., Moscow, 117216, Russia

*Corresponding author: Kristina Yu. Aleshnikova. E-mail: k.aleshnikova@yandex.ru

ORCID: Kristina Y. Aleshnikova – <https://orcid.org/0000-0003-3241-7225>; Vyacheslav N. Dul – <https://orcid.org/0000-0001-7824-4417>; Marina A. Dzhevakhyan – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Olga A. Semkina – <https://orcid.org/0000-0002-2611-4490>.

Received: 06.07.2020. Revised: 21.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Promising sources of preparation of antiinflammatory drugs of interest for practical medicine are substances of plant origin. One of them is eucalimine, isolated from leaves or shoots of eucalyptus prutoid (*Eucalyptus viminalis* Labil) of the myrtle family (*Myrtaceae*), is a purified sum of terpenoid phenolaldehydes of the floriglucine series (euglobals) and triterpenoids.

Aim. The purpose of the present work is to create drug pencils with eucalimine for the prevention and treatment of inflammatory skin diseases.

Materials and methods. The object of research is eucalimine. The study of the shape and size of ecalimine particles and its distribution in various dispersion media: cetyl alcohol, stearyl alcohol, emulsion wax, castor oil, peach oil, medical petroleum jelly was carried out.

Results and discussion. The paper presents the results of experimental studies justifying the selection of adjuvants for medical pencils and their standardization.

Conclusion. The composition and technology of medicinal pencils with eucalimine for external use has been developed, quality indicators have been established.

Keywords: eucalimine, drug sticks, production technology, spectrophotometric analysis, thin layer chromatography.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. The authors of Kristina Yu. Aleshnikova, Marina A. Javakhyan developed the composition of drug pencils, substantiated the choice of auxiliary substances, analyzed and systematized the obtained data. Authors Kristina Yu. Aleshnikova, Vyacheslav N. Dul, Marina A. Javakhyan standardized drug pencils, determination of active substances. Authors Vyacheslav N. Dul, Marina A. Javakhyan, Olga A. Semkina

© Алешникова К. Ю., Дул В. Н., Джавахян М. А., Семкина О. А., 2020

© Aleshnikova K. Yu., Dul V. N., Dzhevakhyan M. A., Semkina O. A., 2020

provided consulting assistance in conducting the experiment. All Authors participated in the discussion of the results, writing and design of the article and theoretical calculations.

For citation: Aleshnikova K. Yu., Dul V. N., Dzhavakhyan M. A., Semkina O. A. Development and standardization of crayons with eucalimine. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-99-106>

ВВЕДЕНИЕ

Профилактика и лечение воспалительных заболеваний кожи в настоящее время представляет серьезную медико-социальную проблему. Накопленный клинический опыт и экспериментальные данные неопровержимо доказывают, что местное медикаментозное лечение ран должно строиться в соответствии с процессами, которые протекают в раневом участке кожи, способствуя их естественному течению. Однако применяемые в практической медицине лекарственные средства зачастую вызывают побочные реакции [1–8]. Так, например, кортикостероиды, йодиды, гидантоины, анаболические стероиды вызывают акнеформную сыпь; аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин и бакампициллин), цефалоспорины, тетрациклины вызывают острый генерализованный экзантематозный пустулез; пеницилламин и другие тиолсодержащие препараты вызывают пузырьчатые высыпания и др. [9].

В последние годы за рубежом получили широкое распространение карандаши лекарственные, которые часто применяются в качестве носителей антисептических, сульфаниламидных препаратов, гормонов, антибиотиков, местных анестетиков и других лекарственных веществ. Вместе с этим активно обсуждается проблема антибиотикорезистентности, а также рост аллергических реакций вследствие применения синтетических лекарственных средств. Особое внимание уделяется разработке инновационных лекарственных форм, содержащих в качестве активного компонента субстанции растительного происхождения, в том числе карандашей лекарственных [10–13]. Например, разработка антимикробного препарата на основе шалфея лекарственного. Авторами исследований [14, 15] сделан вывод о том, что использование растительных экстрактов с антибактериальным эффектом, таким как экстракт шалфея, может снизить риск побочных эффектов, особенно при длительном использовании, не уступая в эффективности синтетическим препаратам.

Таким образом, поиск источников получения безопасных лекарственных средств и разработка на их основе лекарственных препаратов для лечения воспалительных заболеваний кожи с учетом течения патологического процесса, его продолжительности и локализации очага поражения, отвечает требованиям медицинской практики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования: эвкалимин (ФС 42-3605-98), обладающая антимикробной активностью, обусловленной наличием очищенной суммы терпеноидных фенолоальдегидов флороглюцинового ряда (эуглобелей) и тритерпеноидов ($C_{23}H_{30}O_5$ или $C_{28}H_{38}O_5$).

Государственный стандартный образец (ГСО) ВИЛАР эвкалимина ФС 42-3606-98.

Вспомогательные вещества (ВВ): цетиловый спирт Lanett SX EP (гексадеканол-1, цетеарет-25) ТУ 6-09-3813-86, стеариловый спирт (стеарат НБ 5) ТУ 6-09-3940-75, Ph. Eur., воск эмульсионный ТУ 9154-003-0033813-99, масло касторовое медицинское (ГОСТ 18102-95), персиковое (ОФС.1.5.2.0002.15 «Масла жирные растительные»), вазелин медицинский (ФС.2.2.0003.15).

Реактивы и расходные материалы: пластина марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А размером 10 × 15 см, спирт этиловый 95 % (ФС.2.1.0036.15), хлороформ (ГОСТ 20015-88).

Приготовление смеси хлороформ : спирт этиловый (7:3): 70 мл хлороформа смешивают с 30 мл спирта этилового 95 % концентрации в колбе вместимостью 100 мл.

Приготовление 1 % раствора кислоты хлористоводородной: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 500 мл воды очищенной, прибавляют 24,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, перемешивают, доводят объем раствора водой очищенной до метки, перемешивают.

Приготовление подкисленного спирта этилового 95 % концентрации: 1 мл 1 % раствора кислоты хлористоводородной растворяют в 100 мл спирта 95 % концентрации.

Приготовление 1 % спиртового раствора железа окисного хлорид: 1 г железа окисного хлорида растворяют в 100 мл спирта этилового 95 % концентрации.

Приборы и оборудование: рН-метр 121 для определения водородного показателя, весы аналитические ВЛА-200-М, магнитная мешалка Biosan Intelli-Stirrer MSH-300i, прибор для определения точки плавления и температуры кипения Büchi B-540, спектрофотометр Cary 100 Scan и Hewlett-Packard 8452A для количественного анализа карандашей лекарственных с эвкалимином, тестер определения прочности суппозитория ERWEKA SBT 2, универсальная лабораторная установка IKA «MagicLab», тестер для определения

точки плавления суппозитория ERWEKA SSP, тестер для определения времени полной деформации суппозитория ERWEKA PM 30, прибор для определения распадаемости суппозитория «Качающаяся корзинка 545 P-AK-1».

Приготовление раствора ГСО Эвкалимина

Около 0,01 г (точная навеска) ГСО эвкалимина ФС 42-3605-98, предварительно высушенного при температуре от 57 до 63 °С в течение 4 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл подкисленного спирта этилового 95 % концентрации и перемешивают. Объем раствора доводят подкисленным спиртом этиловым 95 % концентрации до метки, перемешивают (раствор А). 5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подкисленным спиртом этиловым 95 % концентрации до метки и перемешивают (раствор Б). Срок годности раствора А – 6 сут при температуре от 5 до 10 °С. Раствор Б используют свежеприготовленным.

Методы исследований: органолептический, изучение растворимости эвкалимина, определение кроющей способности, определение намазываемости основ карандашей лекарственных (метод Jonescus S), определение твердости пластических масс основ карандашей лекарственных, определение массы содержимого упаковки, определение времени полной деформации для карандашей лекарственных на липофильной основе (ОФС.1.4.2.0010.15), определение размера и формы частиц [оптическая микроскопия (ОФС.1.2.1.0009.15)], спектрофотометрический (ОФС.1.2.1.1.0003.15), потенциометрический (ОФС.1.2.1.19.0002.15), ТСХ (ОФС.1.2.1.2.0003.15).

Идентификацию и количественное определение эвкалимина проводили согласно методике, описанной в ФС 42-3605-98 «Эвкалимин» и ФС 42-3607-98 «Растворы с Эвкалимином спиртовые 1 % и 0,25 %» адаптированной для проведения анализа карандашей лекарственных.

Методика подтверждения подлинности эвкалимина методом ТСХ: на линию старта наносят 20 мкл (20 мкг) испытуемого раствора, приготовленного с использованием навески карандаша лекарственного, содержащего эвкалимин и 20 мкл (20 мкг) раствора ГСО эвкалимина. Пластинку с нанесенными пробами высушивают в токе теплого воздуха, помещают в камеру, насыщенную системой растворителей хлороформ: спирт этиловый (7:3) и хроматографируют в течение 1 ч. Когда фронт растворителей достигает 11 см, пластинку вынимают из камеры, сушат при комнатной температуре в течение 30 мин в вытяжном шкафу. Затем обрабатывают 1 % спиртовым раствором железа окисного хлорида, прогревают в сушильном шкафу в течение 5 мин. На хроматограмме испытуемого образца должно наблюдаться коричневое пятно на уровне пятна ГСО эвкалимина, $R_f = 0,55 \pm 0,02$.

Методика количественного определения эвкалимина в лекарственной форме – карандаши: в коническую колбу помещают около 5,0 г карандаша (точная навеска), прибавляют 50 мл подкисленного спирта этилового 95 %, нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки подкисленным 95 % спиртом этиловым (раствор А). 25 мл раствора А помещают в сухой химический стакан, добавляют 4 мл насыщенного раствора калия хлорида. Содержимое стакана перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение 5–7 мин, затем декантируют в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки подкисленным спиртом этиловым 95 %. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б). 1 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки подкисленным спиртом этиловым 95 % (раствор В).

Измеряют оптическую плотность раствора В на спектрофотометре при длине волны 278 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора ГСО эвкалимина. Раствором сравнения служит раствор плацебо карандаша.

Содержание эвкалимина в карандаше вычисляют в процентах (х) по формуле.

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_0 \cdot a_1 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 1} = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 4}{A_0 \cdot a_1},$$

где A_1 – оптическая плотность исследуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО эвкалимина; a_0 – навеска ГСО эвкалимина, г; a_1 – навеска препарата, г.

Содержание эвкалимина в карандаше должно быть от 0,48 до 0,52 %.

Показатели качества карандашей лекарственных в процессе хранения определены в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0010.15 «Хранение лекарственных средств», ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

С целью обоснования состава лекарственной формы с эвкалимином разработаны и изучены 20 экспериментальных образцов плацебо карандашей лекарственных. По результатам предварительного изучения показателей качества основ для карандашей, таких как внешний вид, значение pH, кроющая способность, твердость, намазывающая способность обоснован состав № 11, обладающий оптимальными показателями качества: кроющая способность ($X = 44,44$ %), ($pH = 8,9$), относительное число твердости ($HB = 73,125$) и диаметр основы после действия груза массой $29,5 \pm 0,3$) [16].

Одним из факторов, обеспечивающих показатели качества лекарственных форм и их терапевтический эффект, является технология их получения. Способ введения оказывает значительное влияние на распределение частиц активной субстанции в дисперсионной среде.

В связи с этим проведено изучение формы и размера частиц эвкалимина и его распределение в различных дисперсионных средах (рисунки 1–3).

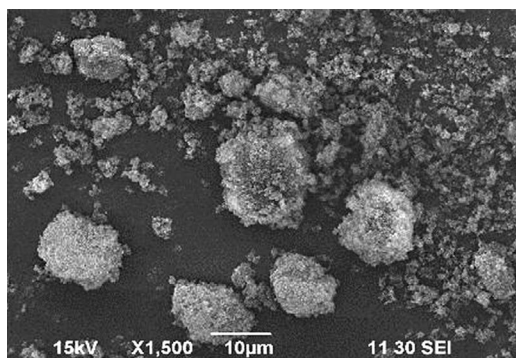


Рисунок 1. Микрофотография частиц эвкалимина объектив x1,5 (увеличение в 1500 раз)

Figure 1. Microphotography of eucalimine particles lens x1.5 (magnification 1500 times)

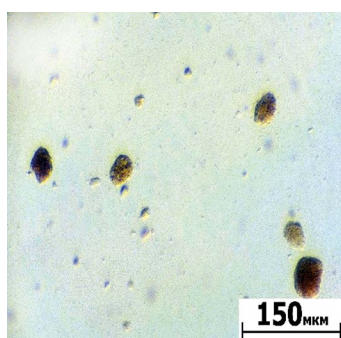


Рисунок 2. Микрофотография частиц эвкалимин в спирте этиловом 95 % (20 °C) объектив x10 (увеличение в 10 раз)

Figure 2. Micrograph of eucalimine particles in alcohol 95 % ethyl (20 °C) lens x10 (10 times magnification)

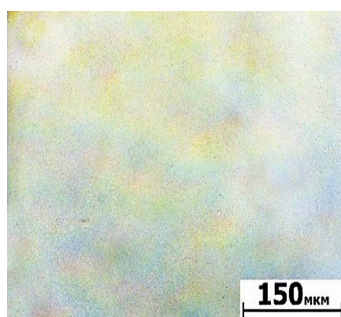


Рисунок 3. Микрофотография частиц эвкалимина в системе растворителей масло персиковое : масло касторовое в соотношении 1:2 объектив x10 (увеличение в 10 раз)

Figure 3. Micrograph of eucalimine particles in the solvent system peach oil : castor oil in a ratio of 1:2 lens x10 (10 times magnification)

Результаты микроскопического анализа показали, что эвкалимин полностью растворяется в системе растворителей масло персиковое : масло касторовое в соотношении 1:2 и в спирте этиловом 95 % при t 50 °C; в спирте этиловом 95 % при t 20 °C наблюдаются отдельные частицы размером от 20 до 60 мкм. Согласно ГОСТ Р 51999-2002 спирт этиловый относится к 3 классу, подклассу 3.2 токсических веществ (знак опасности – по чертежу 3, классификационный шифр 3212), номер ООН 1170 и обладает дегидратационными свойствами, что ограничивает возможность его использования. Эвкалимин растворим в ДМСО, однако использование его в качестве растворителя является нежелательным, так как данный растворитель экстрагирует липопротеиды из поверхностных слоёв кожи и вызывает структурные изменения в роговом слое за счет увеличения скорости всасывания ЛП и вероятность проникновения инфекции [17, 18].

Растворение эвкалимина в системе растворителей масло персиковое : масло касторовое в соотношении 1:2 обеспечивает равномерное распределение субстанции в лекарственной форме (рисунки 3 и 4).

Высокое содержание в касторовом и персиковом маслах глицеридов непредельных кислот способствует увеличению биодоступности и атравматичному нанесению карандашей лекарственных на кожные покровы [19, 20]. Учитывая вышеизложенное в качестве растворителя эвкалимина выбрано масло персиковое с последующей солюбилизацией маслом касторовым.

В результате проведенного исследования разработан и обоснован следующий состав карандашей лекарственных с эвкалимином. Содержание активной субстанции и вспомогательных веществ представлены в таблице 1 из расчета на 100,0 г.

Таблица 1. Состав карандашей лекарственных с эвкалимином

Table 1. Composition of drug pencils with eucalimine

Наименование субстанции Name of substance	Нормативный документ Normative document	Количество, г Quantity, g
Эвкалимин Eucalymin	ФС 42-3605-98 FS 42-3605-98	0,5
Цетиловый спирт Lanett SX EP Cetyl alcohol Lanett SX EP	ТУ 6-09-3813-86 ТУ 6-09-3813-86	10,5
Стеариловый спирт Stearyl alcohol	ТУ 6-09-3940-75 ТУ 6-09-3940-75	10,5
Воск эмульсионный Emulsion wax	ТУ 9154-003-0033813-99 ТУ 9154-003-0033813-99	30,8
Масло персиковое Peach oil	ОФС.1.5.2.0002.15 OFS.1.5.2.0002.15	23,8
Масло касторовое Castor oil	ГОСТ 18102-95 GOST 18102-95	14,0
Вазелин Vaseline	ФС.2.2.0003.15 FS.2.2.0003.15	9,9

Для определения структуры карандаша лекарственного с эвкалимином проведено микроскопическое изучение (рисунок 4).

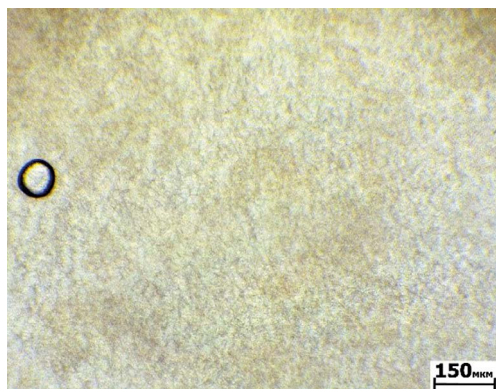


Рисунок 4. Микрофотография карандаша лекарственного с эвкалимином объектив x4 (увеличение в 4 раза)

Figure 4. Micrograph of drug pencil with eucalimine lens x4 (magnification 4 times)

Микрофотография лекарственного карандаша с эвкалимином на продольном срезе демонстрирует отсутствие частиц, воздушного стержня или воронкообразного углубления (рисунок 4).

Наиболее сложным и критическим этапом является трансфер технологий. Разработка рациональной технологической схемы производства проведена с учетом физико-химических свойств субстанции и вспомогательных веществ, входящих в состав карандашей лекарственных (рисунок 5).

Результаты определения средней массы содержимого упаковки карандашей лекарственных, содержащих эвкалимин, составили $4,89 \pm 0,2$, т. е. масса содержимого каждой отдельной упаковки составляет не менее 90 % от указанной в нормативном документе.

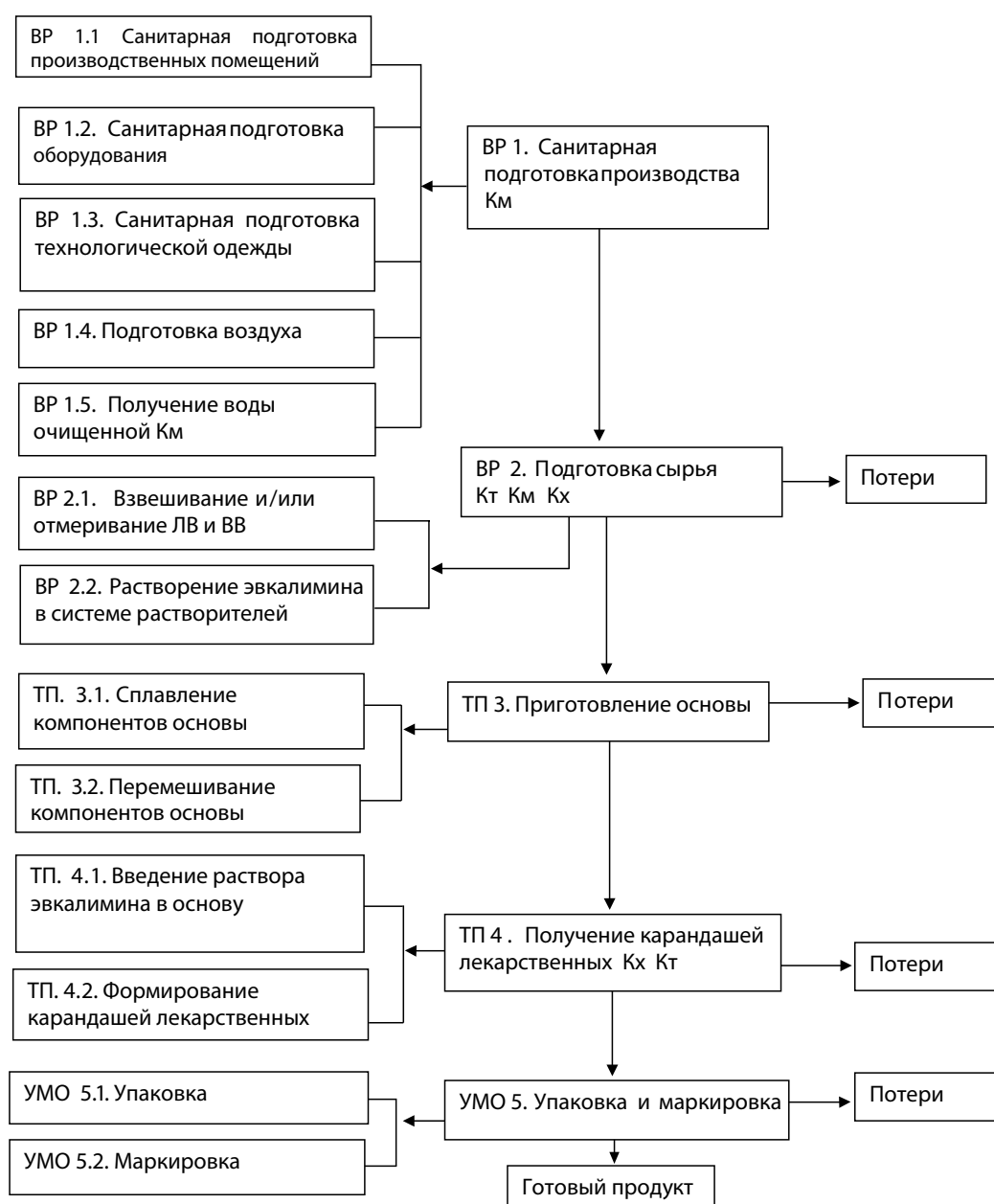


Рисунок 5. Технологическая схема получения карандашей лекарственных с эвкалимином

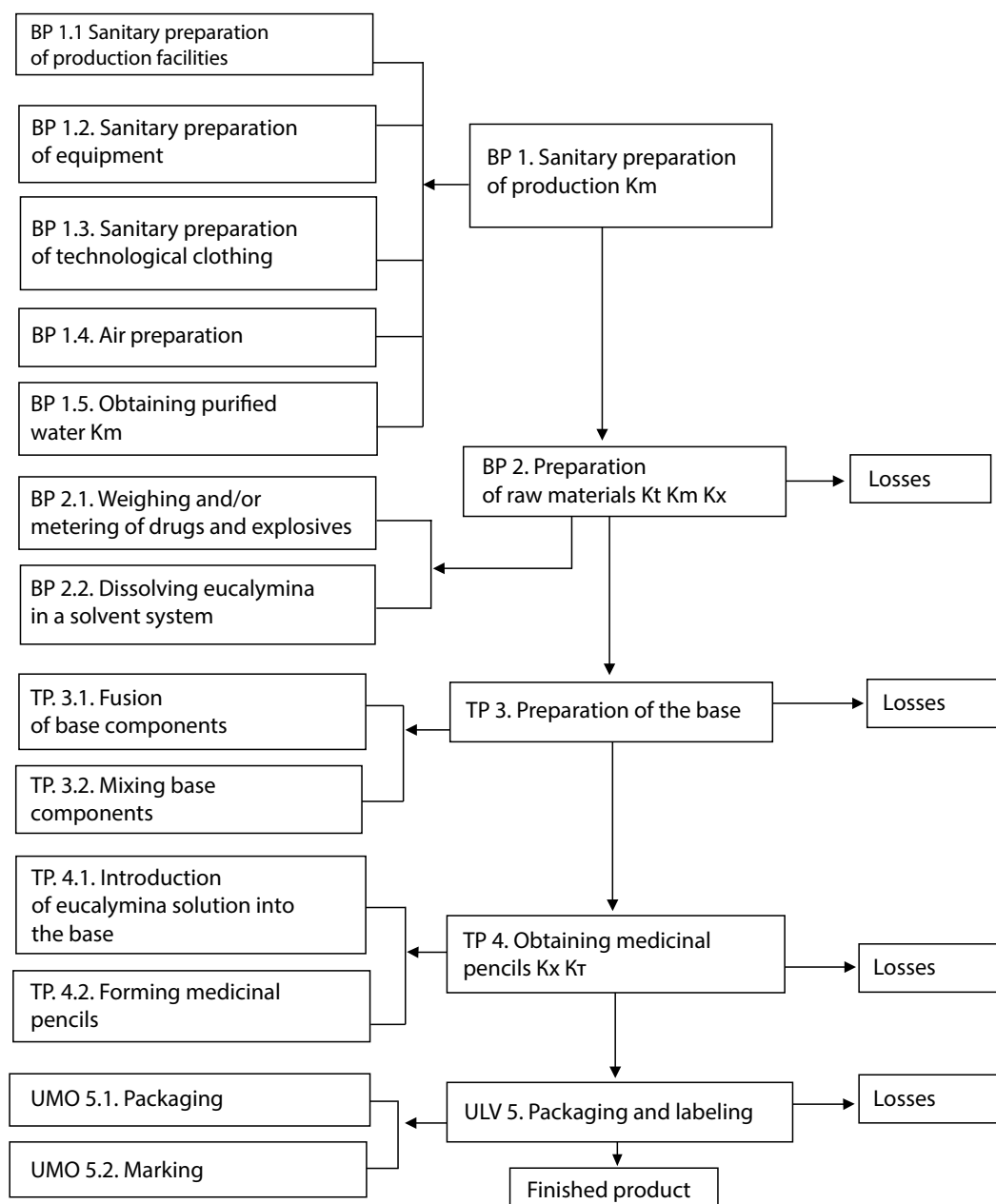


Figure 5. Process diagram of preparation of drug pencils with eucalimin

Изучено время полной деформации карандашей лекарственных с использованием методики, описанной в НД при испытании суппозитория на липофильной основе (прибор 1, $t = 37^\circ\text{C}$).

Учитывая назначение разрабатываемой лекарственной формы необходимо создание условий, обеспечивающих длительное время деформации, которое для исследуемого образца составило 39 ± 2 минуты, по истечении которого игла стержня достигла дна стеклянной трубки, соответствующее нулевому положению маркировочного кольца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты подтверждения подлинности эвкалимина методом ТСХ представлены на рисунке 6.

Результаты анализа, представленные на рисунке 6, считаются достоверными, так как основная зона адсорбции испытуемого раствора карандаша лекарственного с эвкалимином по положению, размеру, цвету и степени свечения соответствует основной зоне адсорбции на хроматограмме раствору сравнения, в качестве которого служил раствор ГСО эвкалимина, $R_f = 0,55 \pm 0,02$ [21].

Для количественного анализа эвкалимина в карандашах лекарственных предложена адаптированная методика определения суммы фенолоальдегидов флороглюцинового ряда (эуглобелей) методом прямой спектрофотометрии (рисунок 7).

Спектр поглощения спиртового извлечения из карандаша лекарственного с эвкалимином имеет максимум поглощения при длине волны 278 ± 2 нм, кото-

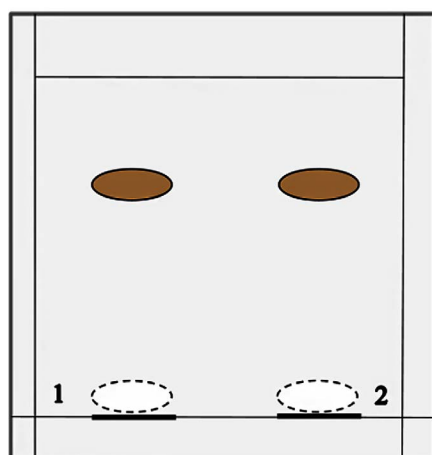


Рисунок 6. Хроматограмма раствора эвкалимина

1 – раствор карандаша лекарственного эвкалимина; 2 – раствор ГСО эвкалимина

Figure 6. Chromatogram of eucalyptine solution

1 – a solution of a pencil of medicinal eucalyptine; 2 – solution of GSO eucalyptine

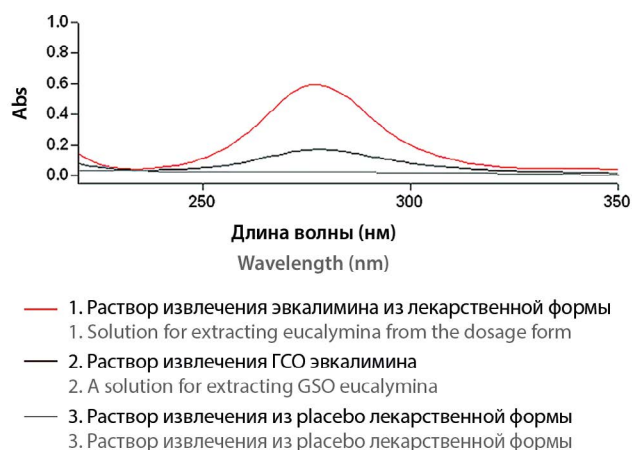


Рисунок 7. УФ-спектр поглощения извлечений из карандашей лекарственных эвкалимина, ГСО эвкалимина и плацебо лекарственной формы

Figure 7. UV absorption spectrum of extracts from sticks of medicinal eucalyptine, GSO eucalyptine and placebo drug form

рый соответствует максимуму поглощения раствора ГСО эвкалимина. Содержание эвкалимина в карандашах лекарственных составило 0,51 %, что соответствует требованиям НД [0,48; 0,52].

Долгосрочные испытания стабильности карандашей лекарственных проведены в соответствии с требованиями ГФ по основным показателям качества: внешний вид, однородность, подлинность, количественное содержание эвкалимина, масса содержимого упаковки. В результате проведенных исследований установлены условия хранения карандашей лекарственных в течение 2 лет 3 месяцев при температуре 15–20 °C и относительной влажности 45 %.

Таким образом, методом микроскопии проведено определение распределения частиц эвкалимина в различных дисперсионных средах и показана целесообразность введения субстанции в карандаши лекарственные в системе растворителей масло персиковое : масло касторовое в соотношении (1:2). На основании результатов изучения растворимости эвкалимина, кроющей способности, намазываемости, твердости пластических масс, времени полной деформации для карандашей лекарственных на липофильной основе, обоснован состав и технология их получения. Установлено содержание эвкалимина в карандашах лекарственных 0,48–0,52 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые разработан лекарственный препарат в виде карандашей лекарственных для наружного применения на основе оригинальной отечественной субстанции – эвкалимин для лечения и профилактики заболеваний кожи. Проведена стандартизация лекарственной формы по основным показателям качества, регламентированным действующими нормативными документами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Применение тизоля в лечении детей с термической травмой. Сб. научн. трудов. Челябинск: *Актуальные проблемы современной комбустиологии, реаниматологии и экстремальной медицины*. 1996. С. 167–168.
2. Хаждай Я. И. и др. Особенности изучения безвредности мазей и суппозитория. *Фармация*. 1983;32(1):22–26.
3. Ягодка В. С. Фитотерапия в дерматологии и косметике. Киев: *Урожай*, 1993. 142 с.
4. Гончаренко В. Л. Научные основы государственного управления системой охраны здоровья населения Российской Федерации в условиях становления рыночной экономики. Дис. ... докт. мед. наук. 1999. 66 с.
5. Соколов С. Я., Замотаев И. П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). М.: *Медицина*, 1988. 464 с.
6. Valenta C., Christen B., Bemkop-Schnurch A. Chitosan-EDTA conjugate: a novel polymer for topical gels. Institute of Pharmaceutical Technology, University of Vienna. Vienna: *J-Pharm-Pharmacol*. 1998;50(5):445–452.
7. Крутикова Н. М., Вичканова С. А. Изучение антибактериальных свойств эвкалимина в свете современного подхода к препаратам антимикробного действия. М.: *ВИЛАР*. 2001. С. 338–346.
8. Бортникова В. В., Крепкова Л. В., Крутикова Н. М., Фатеева Т. В. Доклиническое изучение эвкалимина – лекарственного средства антимикробного действия. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;21(4):35–45.
9. Gonzalez M. E. Introduction to Hypersensitivity and Inflammatory Skin Disorders. *MSD MANUAL Consumer Version*. 2018. 12–37 p.
10. Patterson R. A., Stankewicz H. A. Penicillin Allergy. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459320/> Accessed 23.04.2019.
11. Abrams E. M., Ben-Shoshan M. Delabeling penicillin allergy: Is skin testing required at all? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7(4):1377.
12. Vervloet D., Durham S. Adverse reactions to drugs. *BMJ*. 1998;316(7143):1511–1514. DOI: 10.1136/bmj.316.7143.1511.
13. Warrington R., Silviu-Dan F., Wong T. Drug allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018;14(2):60. DOI: 10.1186/s13223-018-0289-y.
14. Lanzalaco A. C., Rocchetta H. L., Gordon S., Kolodzik J. Clinical effect of a three-day application of a commercial deodorant on axilla malodor intensity, microbial population level, and longevity of fragrance expression. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:73.

15. Shahtalebi M. A., Ghanadian M., Farzan A., Shiri N., Shokri D., Fatemi S. A. Deodorant effects of a sage extract stick: Antibacterial activity and sensory evaluation of axillary deodorancy. *J Res Med Sci.* 2013;18(10):833–839.
16. Алешникова К. Ю., Джавахян М. А. Технологические аспекты разработки карандашей лекарственных с эвкалимином. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2019;22(3):37–41.
17. Семкина О. А. Разработка состава и технологии мягких лекарственных форм эвкалимина. Дис. ... канд. фарм. наук. Москва, 2005. 182 с. Доступно по: <https://www.dissercat.com/content/razrabotka-sostava-i-tehnologii-mygkikh-lekarstvennykh-form-evkalimina>. Ссылка активна на 13.08.2019.
18. Володина Т. А., Пеневская Н. А., Викторов С. И., Огай М. А., Майорова А. В. Исследование репаративных свойств фитогеля, содержащего экстракты чабреца и солодки. *Фундаментальные исследования.* 2012;11(2):472–477. Доступно по: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=30561>. Ссылка активна на 13.08.2019.
19. Bruni N., Della P. C., Oliaro-Bosso S., Pessione E., Gastaldi D., Dosio F. Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment. *Molecules.* 2018;23(10):2478. DOI: 10.3390/molecules23102478.
20. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 280 с.
21. Георгивский, В. П. Применение хроматографии в тонких слоях сорбента для идентификации и количественного определения биологически активных веществ растительного происхождения. М.: ЦБНТИ МЕДПРОМ, 1975. 64 с.
15. Shahtalebi M. A., Ghanadian M., Farzan A., Shiri N., Shokri D., Fatemi S. A. Deodorant effects of a sage extract stick: Antibacterial activity and sensory evaluation of axillary deodorancy. *J Res Med Sci.* 2013;18(10):833–839.
16. Aleshnikova K. Yu., Javakhyan M. A. Technological aspects of the development of drug pencils with eucalimine. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2019;22(3):37–41.
17. Semkina O. A. Development of the composition and technology of soft dosage forms of eucalimine. Dis. ... Cand. of Sci. Pharm. Moscow, 2005. 182 p. Available at: <https://www.dissercat.com/content/razrabotka-sostava-i-tehnologii-mygkikh-lekarstvennykh-form-evkalimina>. Accessed 13.08.2019.
18. Volodina T. A., Penyevskaya N. A., Viktorov S. I., Ogai M. A., Mayorova A. V. Study of the reparative properties of a phytogel containing extracts of thyme and licorice. *Fundamental'nye issledovaniya;* 2012;11(2):472–477. Available at: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=30561>. Accessed 13.08.2019.
19. Bruni N., Della P. C., Oliaro-Bosso S., Pessione E., Gastaldi D., Dosio F. Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment. *Molecules.* 2018;23(10):2478. DOI: 10.3390/molecules23102478.
20. Adler Yu. P., Markova E. V., Granovsky Yu. V. Experiment planning when searching for optimal conditions. Moscow: Nauka, 1976. 280 p.
21. Georgivsky, V.P. The use of chromatography in thin layers of the sorbent for the identification and quantitative determination of biologically active substances of plant origin. Moscow: CBNTI MEDPROM, 1975. 64 p.

REFERENCES

1. The use of tysol in the treatment of children with thermal trauma. Sat. nauchn.works. Chelyabinsk: *Aktual'nye problemy sovremennoj kombustologii, reanimatologii i ekstremal'noj mediciny.* 1996. P. 167–168.
2. Hazhdai Y. I. et al. Features of the study of harmlessness of ointments and suppositories. *Farmaciya = Pharmacy.* 1983;32(1):22–26.
3. Yagodka B. C. Phytotherapy in dermatology and cosmetics. Kiev: *Urozhaj,* 1993. 142 p.
4. Goncharenko V. L. Scientific foundations of state management of the health protection system of the population of the Russian Federation in the context of the formation of a market economy. Dis. ... Dr. of Sci. 1999. 66 p.
5. Sokolov S. Ya., Zamotaev I. P. Handbook on medicinal plants (Phytotherapy). Moscow: *Meditsina,* 1988. 464 p.
6. Valenta C., Christen B., Bemkop-Schnurch A. Chitosan-EDTA conjugate: a novel polymer for topical gels. Institute of Pharmaceutical Technology, University of Vienna. Vienna: *J-Pharm-Pharmacol.* 1998;50(5):445–452.
7. Krutikova N. M., Vickanova S. A. Study of the antibacterial properties of eucalimine in light of the modern approach to antimicrobial drugs. Moscow: *VILAR.* 2001. 338–346 p.
8. Bortnikova V. V., Krepkova L. V., Krutikova N. M., Fateeva T. V. Preclinical study of eucalimine – an antimicrobial drug. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2018;21(4):35–45.
9. Gonzalez M. E. Introduction to Hypersensitivity and Inflammatory Skin Disorders. *MSD MANUAL Consumer Version.* 2018. 12–37 p.
10. Patterson R. A., Stankewicz H. A. Penicillin Allergy. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459320/> Accessed 23.04.2019.
11. Abrams E. M., Ben-Shoshan M. Delabeling penicillin allergy: Is skin testing required at all? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(4):1377.
12. Vervloet D., Durham S. Adverse reactions to drugs. *BMJ.* 1998;316(7143):1511–1514. DOI: 10.1136/bmj.316.7143.1511.
13. Warrington R., Silviu-Dan F., Wong T. Drug allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology.* 2018;14(2):60. DOI: 10.1186/s13223-018-0289-y.
14. Lanzalaco A. C., Rocchetta H. L., Gordon S., Kolodzick J. Clinical effect of a three-day application of a commercial deodorant on axilla malodor intensity, microbial population level, and longevity of fragrance expression. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50:73.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>
УДК 615.453.82



Оригинальная статья/Research article

Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения стероидного сапогенина диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L.

А. Е. Суханов^{1*}, А. Н. Ставрианиди², Е. Д. Кубасова¹, А. С. Панасюк¹, О. В. Буюклинская¹

1 – ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России), фармацевтический факультет, кафедра фармации и фармакологии, 163001, Россия, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51
2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), химический факультет, кафедра аналитической химии, 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

*Контактное лицо: Суханов Антон Евгеньевич. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: А. Е. Суханов – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; А. Н. Ставрианиди – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Е. Д. Кубасова – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; А. С. Панасюк – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Статья поступила: 12.08.2020. Статья принята в печать: 02.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Современные фармакогностические исследования направлены на поиск растительных биологически активных индивидуальных соединений (далее – РБАИС), выделяемых из растительных экстрактов.

Цель. Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения сапогенина диосгенина в растительных экстрактах из семян пажитника сенного.

Материалы и методы. Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сенного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья, ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Валидация методики была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в соответствии с требованиями ГФ XIV. Для анализа использовалась одна серия лекарственного растительного сырья: номер серии – 010117, дата выпуска – 15 февраля 2017 г.

Результаты и обсуждение. Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости.

Заключение. Установлено, что разработанная методика идентификации и количественного определения диосгенина в экстрактах семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ является правильной, прецизионной, специфичной и линейной в аналитической области.

Ключевые слова: семена пажитника сенного, диосгенин, ВЭЖХ-УФ, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. Е. Суханов и А. Н. Ставрианиди разработали методику валидации метода количественного определения стероидного сапогенина диосгенина ВЭЖХ-УФ. Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк и О. В. Буюклинская проводили интерпретацию результатов анализа. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов анализов. Ранее авторами апробирована методика идентификации и количественного определения диосгенина в растительных экстрактах семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ в изократическом режиме элюирования.

Для цитирования: Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В. Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения стероидного сапогенина диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>

Validation of the HPLC-UV Method for Quantitative Determination of Steroid Sapogenin Diosgenin from Hay Fenugreek Seeds, *Trigonella Foenum-graecum* L.

Anton E. Sukhanov^{1*}, Andrey N. Stavrianiidi², Elena D. Kubasova¹, Alexandra S. Panasyuk¹, Olga V. Buyuklinskaya¹

1 – Northern State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy and Pharmacology, 51, Troitsky av., Arkhangelsk, 163000, Russia
2 – Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, 1/3, Leninskie Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Anton E. Sukhanov. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: Anton E. Sukhanov – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; Andrey N. Stavrianiidi – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Elena D. Kubasova – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; Alexandra S. Panasyuk – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; Olga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Received: 12.08.2020. Revised: 02.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Modern pharmacognostic research is aimed at searching for plant biologically active individual compounds (hereinafter referred to as RBAIS) isolated from plant extracts.

Aim. Validation of HPLC-UV quantitative determination of sapogenin diosgenin in plant extracts from fenugreek seeds.

Materials and methods. The object of study was raw materials-fenugreek seeds produced as medicinal plant raw materials by LLC «Sage» (Irkutsk). Validation of the method was carried out according to the parameters: specificity, linearity, correctness, precision in accordance with the requirements of SP XIV. One series of medicinal plant raw materials was used for the analysis, such as serial number – 010117, release date – 15 february 2017.

Results and discussion. Validation characteristics were determined and their compliance with the necessary acceptance criteria was experimentally confirmed.

© Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В., 2020

© Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V., 2020

Conclusion. It is established that the developed method of identification and quantitative determination of diosgenin in fenugreek seed extracts by HPLC-UV is correct, precise, specific and linear in the analytical field.

Keywords: fenugreek seeds, diosgenin, HPLC-UV, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anton E. Sukhanov and Andrey N. Stavrianidi developed a validation method for the quantitative determination of the steroid sapogenin diosgenin HPLC-UV. Elena D. Kubasova, Alexandra S. Panasyuk and Olga V. Buyuklinskaya interpreted the results of the analysis. All the authors participated in the discussion of the results of the analyses. Previously, the authors tested the method of identification and quantitative determination of diosgenin in plant extracts of fenugreek seeds by HPLC-UV in the isocratic elution mode.

For citation: Sukhanov A. E., Stavrianidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V. Validation of the HPLC-UV method for quantitative determination of steroid sapogenin diosgenin from hay fenugreek seeds, *Trigonella foenum-graecum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время российский фармацевтический рынок нуждается в эффективных лекарственных препаратах растительного происхождения. Диосцин и его агликон диосгенин являются основными хемосистематическими маркерами лекарственных растений диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Mikino) и якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.). Стероидный сапогенин диосгенин используется в химико-фармацевтической промышленности как исходный продукт для синтеза стероидных гормонов, для получения препарата «Полиспонин» (в составе сухого экстракта диоскореи ниппонской) и входит в состав сухих экстрактов диоскореи ниппонской и якорцев стелющихся, а также в составе комплексных смесей для пауэрлифтеров «Трибулус».

Стероидный сапогенин диосгенин был идентифицирован в сырье видов: диоскореи (ямс), якорцев, юкк, спаржи, и является довольно-таки распространенным стероидным сапогенином в определенных видах растений, обнаружен в составе тканей некоторых представителей семейства бобовые.

Нами из сырья семян пажитника сенного (*Trigonella foenum-graecum* L.) был выделен и идентифицирован стероидный сапогенин диосгенин.

Цель работы – валидация аналитической методики идентификации и количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в растительных экстрактах из семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сенного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья, ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Для анализа использовалась одна серия лекарственного растительного сырья: номер серии – 010117, дата выпуска – 15 февраля 2017 г.

Основные реактивы

Ацетонитрил, ч.д.а., HPLC Gradient 99,9 % (Biochem Chemopharma, Франция).

Кислота хлористоводородная, х.ч. 37,3 % (ГОСТ 3118-77, АО «Ленреактив», Россия).

Спирт изопропиловый, х.ч. 99,9 % (ЗАО «ЭКОС-1», Россия).

Диосгенин, порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 % навеска 100 мг, серия 011118 (ООО «Фитопанacea», Россия).

Вспомогательное оборудование

Весы аналитические электронные «Acculab ALC-210d4» (Sartorius Group, США) с диаметром весовой чаши 80 мм и максимальной нагрузкой 210 г.

Ванна ультразвуковая ВУ-09-«Я-ВП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) с объёмом рабочей ёмкости 2,7 л и резонансной частотой 40 кГц.

Шейкер лабораторный «Laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша).

Центрифуга лабораторная ОПн-8 (ОАО ТНК «Дастан», Россия) со скоростью 8000 об/мин.

Мельница лабораторная ЛМ-202 (ООО «ПЛАУН-система», Россия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 10 мкл до 100 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 0,1 мкл до 3 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Ленпипет с постоянным объёмом дозирования 1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, США).

Методика и параметры хроматографирования

Параметры хроматографирования: градиентный высокоэффективный жидкостный хроматограф «Стайер» (АО «Аквилон», Россия) с двумя прецизионными насосами высокого давления серии I и серии II (для градиентных систем), динамического смесителя «MS 16», контроллера термостата колонки «TS10» и дегазатора элюента «DG 18». Детектор спектрофотометрический «UVV-104.1M» с рабочим диапазоном длин волн от 190 до 600 нм. Рабочая длина волны де-

тектора – 205 нм. Инжектор ручного типа «Rheodyne» с объёмом петли 20 мкл. Обращённо-фазовая колонка «Luna, 250 × 4,6 мм, 3 мкм», заполненная сорбентом на основе гидрофобизированного силикагеля C18 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из одного растворителя – ацетонитрил, ч.д.а. 99,9 %, HPLC Gradient 99,9 % (Biochem Chemopharma, Франция). Скорость подачи подвижной фазы в изократическом режиме – 0,4 мл/мин. Температура колонки – 60 °С.

Объём вводимой пробы – 20 мкл. Петлю дозатора объёмом 20 мкл промывали 3-кратным объёмом пробы.

Обработка хроматограмм. Обработку полученных хроматограмм производили в ручном режиме с использованием автоматизированной системы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсэнд» (Россия).

Количественное определение диосгенина в лекарственном растительном сырье с использованием градуировочных растворов в «ручном» режиме подсчёта концентрации.

Точную навеску растительного государственного стандартного образца (РГСО) диосгенина (порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 %) массой 20 мг растворяли в 20 мл комбинированного растворителя состава: 16 мл 99,9 % ацетонитрила, ч.д.а. (Biochem Chemopharma, Франция), 2 мл воды деионизированной, 2 мл 99,9 % изопропанола, х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия) (8:1:1 по объёму). Это стандартный раствор РГСО диосгенина с концентрацией 1000 мкг/мл (1 мг/мл).

Приготовленный стандартный раствор РГСО диосгенина использовался для получения серии рабочих (градуировочных) растворов РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 мкг/мл до 1000 мкг/мл, а именно: 62,5 мкг/мл (0,625 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 125 мкг/мл (1,25 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 250 мкг/мл (2,5 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 500 мкг/мл (5 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 1000 мкг/мл (стандартный раствор РГСО с концентрацией 1 мг/мл).

Методики пробоподготовки растительного сырья

По литературным данным наиболее широко используемым растворителем для экстракции из растительного сырья стероидных сапонинов и сапогенинов является метанол или его комбинации с другими органическими растворителями [1]. Однако метанол ядовит и не все химические лаборатории имеют лицензию на использование метилового спирта в своей деятельности. В ходе дальнейших изысканий оптимального органического растворителя для экстрак-

ции стероидных сапогенинов из растительного материала [2] показали наибольшую приемлемость для данной цели 50 % водный раствор изопропанола в комбинации с озвучиванием в течение 10 минут. Однако подэтап кислотного гидролиза, содержащегося в экстрактах гликозида диосцина, не был указан. Кислотный гидролиз необходим для разрыва О-гликозидной связи между гликоном и агликоном (диосгенином) с целью увеличения выхода диосгенина в процессе экстракции.

Экстракция стероидного сапогенина диосгенина для целей ВЭЖХ-УФ проводилась по методике в модификации [3–4].

Этап пробоподготовки № 1. Отбирали по 0,5 г измельчённых семян и последовательно добавляли в колбы для экстракции 8,5 мл 50 % водного раствора изопропанола, х.ч., перемешивая на лабораторном шейкере «Laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша) после каждого добавления в течение одного часа. Изопропанольный экстракт был подвержен гидролизу 5 % раствором кислоты хлористоводородной, ч.д.а. в 50 % водном растворе изопропанола, ч.д.а. (10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной, х.ч. и 10 мл 99,9 % изопропанола, х.ч.) в течение 4 часов на песчаной бане при температуре 70 °С при мощности 150 Вт. Суммарный объём экстракта до начала термического гидролиза составлял 28,5 мл. По мере испарения изопропанола и уменьшения объёма экстракта в процессе кислотного гидролиза на протяжении 4 часов в колбу добавляли смесь 10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной и 10 мл 99,9 % изопропанола. После проведения термического кислотного гидролиза надосадочную жидкость (изопропанольный экстракт) декантировали в фарфоровые чашки для упаривания остаточной жидкой фазы на песчаной бане до получения сухого остатка, не допуская подгорания последнего. Массу сухих остатков взвешивали на аналитических весах «Acculab ALC-210d4» с точностью до четвёртого знака после запятой. В дальнейшем от каждой массы сухих остатков отбирали по 100 мг (точная навеска) сухого экстракта, помещали в вials объёмом 10 мл.

Этап пробоподготовки № 2. В каждую виалу добавляли по 10 мл 50 % водного раствора изопропанола. В дальнейшем проводили экстракцию в виалах в ванне ультразвуковой ВУ-09-«Я-ВП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) при комнатной температуре с озвучиванием в течение 15 минут. Отбирали по 5 мл из каждой виалы надосадочной жидкости и фильтровали через фильтр с размерами пор 0,45 мкм. Отбрасывали первые 4 мл экстракта, и отбирали по 1 мл полученного фильтрата в пробирку микроцентрифужную «эппендорф» с крышкой для центрифугирования объёмом 1,5 мл. Далее центрифугировали на центрифуге «ОПн-8» (Россия) в течение 20 минут при 8000 об/мин и отбирали 1000 мкл надосадочной жидкости в виалу для ВЭЖХ-УФ анализа.

Методика определения времени удерживания диосгенина в заданных хроматографических условиях с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл

Для определения времени удерживания диосгенина в данной хроматографической системе ВЭЖХ-УФ производили инъекцию раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл в колонку. Объём инъекции составлял 60 мкл (3-кратное значение от объёма петли инжектора в 20 мкл). Фиксировали время появления наиболее выраженного пика в диапазоне времени от 0 до 30 минут.

Рабочая длина волны была установлена на 205 нм для количественного анализа РГСО диосгенина при стабильности базовой линии, отсутствии пиковых помех и максимальной степени поглощения диосгенином при заданной длине волны. Был выбран искомый режим элюирования для разделения диосгенина в образцах растительных экстрактов [согласно паспорту анализа фитохимического стандарта диосгенина компании «Chromadex» (США), лот № 00004916-351].

Методика проведения холостого опыта с использованием пробы подвижной фазы в изократическом режиме

Холостой опыт был проведён с использованием пробы подвижной фазы. Подвижная фаза состояла из одного компонента: ацетонитрил 99,9 %, ч.д.а. (фаза А).

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализе растительных экстрактов.

Методика проведения холостого опыта с использованием пробы комбинированного растворителя

Холостой опыт был проведён инъекцией в хроматографическую колонку пробы комбинированного растворителя: 99,9 % ацетонитрил – вода деионизированная – 99,9 % изопропанол в соотношении 8:1:1 с использованием изократического режима элюирования.

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализе растительных экстрактов.

Методика количественного определения

Количественное определение диосгенина в растительных экстрактах и в лекарственном растительном сырье с использованием внешнего стандарта (ЕСМ-метод) в «ручном» режиме подсчёта концентрации.

Расчёт количественного содержания диосгенина в растительных экстрактах осуществлялся методом внешнего стандарта с использованием рабочего раствора растительного государственного стандартного образца (далее – РГСО) с концентрацией 250 мкг/мл и производился по формулам:

$$C_{\text{экстр.}} = \frac{S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P}{S_{\text{станд.}} \cdot V_{1\text{станд.}} \cdot V_{2\text{станд.}} \cdot 100 \%}, \quad (1)$$

где 100 % – множитель для сокращения процентов; $a_{\text{станд.}}$ – навеска стандарта растительного вещества для приготовления раствора РГСО (точная навеска), 20 мг; $C_{\text{экстр.}}$ – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл; P – содержание чистого вещества в стандарте, не менее 98,5 %; $S_{\text{иссл.}}$ – площадь пика диосгенина в растительном экстракте, mAU · c; $S_{\text{станд.}}$ – площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина, mAU · c; $V_{1\text{станд.}}$ – объём растворителя для приготовления стандартного раствора РГСО, 20 мл; $V_{2\text{станд.}}$ – объём растворителя для приготовления рабочего раствора РГСО, до 10 мл; $V_{\text{аликв.}}$ – объём аликвоты, пошедший на растворение, для приготовления рабочего раствора РГСО, например, с концентрацией 250 мкг/мл, 2,5 мл.

Расчёт содержания диосгенина в сухом сырье:

$$C_{\text{иссл.}} = \frac{C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100 \%}{a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100 \% - W \%)}, \quad (2)$$

где 100 % – сокращение процентов по показателю «влажность сырья»; a – навеска исходного растительного сырья, 500 мг; $a_{\text{сух.}}$ – масса сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания (точное взвешивание), мг; $a_{\text{сух.1}}$ – навеска от сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки (точная навеска), мг; $C_{\text{экстр.}}$ – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл; V – объём раствора в вials, 10 мл; $C_{\text{иссл.}}$ – содержание диосгенина в сухом сырье – семенах пажитника сенного, мг/г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Метрологические характеристики по расчёту показателя абсолютной влажности сырья – семян пажитника сенного: средняя арифметическая (Mean) = 0,1069 или 10,69 % (95 % ДИ: 0,1041–0,1097). Стандартное отклонение (Std. dev.) = 0,0026606. Содержание влаги для сырья – семян пажитника сенного по Eur. Ph. Vol. 7.0 должно быть не более 12,00 %.

Для оценки усреднённого содержания в семенах пажитника сенного (серия – 010117, дата выпуск – 15.02.2017 г.) диосгенина с учётом влажности сырья использовали методы описательной статистики. Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина) в семенах пажитника сенного с учётом влажности сырья составляет ($M \pm \sigma$) $5,3 \pm 0,05$ мг/г (95 % ДИ: 5,1–5,4 мг/г; $n = 6$).

Валидация аналитической методики

Правильность методики

Правильность аналитической методики выражает близость между принятым истинным значением и полученным значением. Правильность выражается величиной открываемости.

Открываемость – соотношение между полученным средним и истинным значениями с учётом соответствующих доверительных интервалов. Показателем правильности метода обычно является значение систематической погрешности. Правильность оценивается на основании не менее 9 результатов определений минимум на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области (3 повторности для 3 концентраций). Готовят 3 модельные смеси для каждой из 3 концентраций: 80 %, 100 % и 120 %.

Оценка проводилась путём расчёта процента определения известной концентрации, стандартного отклонения и коэффициента вариации, доверительного интервала для меры положения – среднего значения (таблица 1).

За аргумент было взято значение содержания диосгенина в сухом исходном сырье для уровня концентрации 100 % в 100 мг – 5,3 мг/г диосгенина.

Описательная статистика правильности методики анализа отражена в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, коэффициент вариации составляет менее 2,00 %. Среднее значение составляет 5,38 мг/г и находится внутри регламентирован-

ного диапазона 99–101 %. Доверительный интервал среднего значения включает 100%-е значение.

Таблица 2. Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности методики ВЭЖХ УФ стероидного сапогенина диосгенина по методу внешнего стандарта – в сравнении с площадью пика раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл ($p = 95 \%$)

Table 2. Results of statistical processing of experimental data, obtained when studying the correctness of the HPLC-UV steroid sapogenin diosgenin by the external standard method-in comparison with the peak area of the solution of standard diosgenin with a concentration of 250 mcg/ml ($p = 95 \%$)

Статистический показатель Statistical indicator	Результат Result
Среднее значение ($C_{\text{исп.}}$), мг/г Average value ($C_{\text{iss.}}$), mg/g	5,38
Стандартное отклонение Standard deviation	0,0971825
Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %	1,81
Нижняя граница 95 % доверительного интервала Lower bound of 95 % confidence interval	5,303
Верхняя граница 95 % доверительного интервала The upper limit of the 95 % confidence interval	5,452

Прецизионность методики. Выражает близость результатов между сериями измерений, проведёнными из множества проб, взятых из одной и той же од-

Таблица 1. Параметры установления правильности методики ВЭЖХ-УФ стероидного сапогенина диосгенина по методу внешнего стандарта – в сравнении с площадью пика раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл

Table 1. Parameters for determining the correctness of the HPLC-UV method of steroid sapogenin diosgenin by the external standard method-in comparison with the peak area of the standard diosgenin solution with a concentration of 250 mcg/ml

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Масса сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания (точное взвешивание), мг The dry weight of the residue of the raw material after acid hydrolysis and evaporation (accurate weighing), mg	Навеска сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки (точная навеска), мг Dry residue suspension after acid hydrolysis and evaporation, taken for the subsequent 2nd stage of sample preparation (exact suspension), mg	Площадь пика образца, mAU · с Sample peak area, mAU · s	Содержание в экстракте из семян пажитника сеного после двух этапов пробоподготовки ($C_{\text{эксп.}}$), мг/мл The contents in the extract from the seeds of fenugreek after two stages of sample preparation ($C_{\text{extr.}}$), mg/ml	Содержание в сухом исходном сырье – семенах пажитника сеного ($C_{\text{исп.}}$), мг/г The content in dry raw materials – the seeds of fenugreek ($C_{\text{ress.}}$), mg/g	Отклик, % Response, %
80	276	80	665,37	0,06838	5,3	100,00
	284	80	665,46	0,06839	5,4	101,89
	283	81	674,95	0,06936	5,4	101,89
100	276	100	833,47	0,08566	5,3	100,00
	272	101	830,45	0,08534	5,2	98,11
	279	102	840,00	0,08633	5,4	101,89
120	286	120	1001,15	0,10289	5,5	103,77
	288	119	992,65	0,10201	5,5	103,77
	283	121	1010,25	0,10382	5,4	101,89

нородной пробы. Прецизионность устанавливается на трех уровнях: повторяемость, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность и воспроизводимость (межлабораторная прецизионность).

1-й уровень – **повторяемость методики**. Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в течение короткого промежутка времени.

Результаты 6 параллельных испытаний по сырью пажитника сенного представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты оценки повторяемости методики количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сенного

Table 3. Results of evaluation of repeatability of the method of quantitative determination of steroid sapogenin diosgenin in fenugreek seeds

Результаты анализа с учётом влажности сырья, мг/г The results of the analysis taking into account raw material water content, mg/g	Средний результат, мг/г Average result, mg/g	Стандартное отклонение, мг/г Standard deviation, mg/g	Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %	Доверительный интервал для среднего результата при 95 % уровне значимости, мг/г Confidence interval for the average result at 95 % significance level, mg/g
5,3	5,27	0,1211	2,30	5,14 – 5,39
5,1				
5,4				
5,2				
5,4				
5,2				

Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) отдельных результатов составляет 2,30 %.

2-й уровень – **промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность**. Характеризует влияние вариаций внутри лаборатории на результаты испытаний отдельных идентичных образцов, отобранных в одной и той же серии. Анализ проводили два исполнителя в разные дни на одном и том же оборудовании с применением одних и тех же реактивов. Результаты внутрилабораторной прецизионности представлены в таблице 4.

Специфичность методики

Способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество независимо от других веществ, присутствующих в испытуемом образце.

В результате исследования на хроматограмме растительных экстрактов семян пажитника сенного наблюдался пик диосгенина с временем удерживания 15,2 минут времени выхода. Это же время выхода наблюдалось при хроматографировании растворов

РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл, что и обеспечивает специфичность данной методики в присутствии подвижной фазы А – ацетонитрила (х.ч.) и компонентов комбинированного растворителя – ацетонитрила (х.ч.) и изопропанола (х.ч.).

Таблица 4. Результаты промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сенного

Table 4. Results of intermediate (intra-laboratory) precision of the method quantitative determination of the steroid sapogenin diosgenin in the seeds of fenugreek

Исполнитель Executor	Дата анализа Date of analysis	Результаты анализа с учётом влажности сырья, мг/г The results of the analysis taking into account raw material water content, mg/g	Средний результат, мг/г Average result, mg/g	Стандартное отклонение, мг/г Standard deviation, mg/g	Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %
№ 1	20.01.2020	5,3	5,23	0,10328	1,97
	20.01.2020	5,2			
	21.01.2020	5,4			
	21.01.2020	5,1			
	21.01.2020	5,2			
	21.01.2020	5,2			
№ 2	22.01.2020	5,5	5,23	0,15055	2,88
	22.01.2020	5,1			
	22.01.2020	5,2			
	24.01.2020	5,2			
	24.01.2020	5,1			
	24.01.2020	5,3			

Для идентификации диосгенина по времени выхода в указанных хроматографических условиях и определения площади пика диосгенина с целью расчёта концентрации диосгенина «ручным» способом в растительном экстракте методом внешнего стандарта с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл производили инъекцию данного раствора в инжектор.

На рисунке 1 представлена хроматограмма раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях – 15,2 минут времени выхода. В отчёте площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл составила 2396,14 mAU · с.

В результате анализа 1-го образца растительного экстракта семян пажитника сенного в указанных хроматографических условиях была получена хроматограмма, представленная на рисунке 2.

На рисунке 2 представлена хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сенного. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях – 15,2 минут времени выхода.

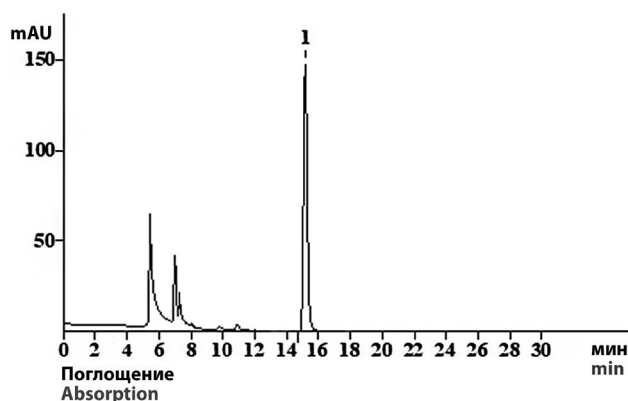


Рисунок 1. Хроматограмма стандартного раствора РГСО диосгенина в указанных хроматографических условиях с концентрацией 250 мкг/мл.

Пик 1 – пик диосгенина

Figure 1. Chromatogram of a standard solution of standard diosgenin under the specified chromatographic conditions with a concentration of 250 micrograms/ml.

Peak 1 – diosgenin peak

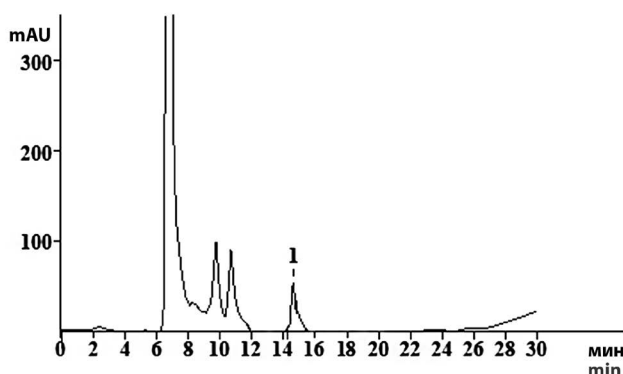


Рисунок 2. Хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного в указанных хроматографических условиях.

Пик 1 – пик диосгенина

Figure 2. Chromatogram of plant extract of fenugreek seeds under the specified chromatographic conditions.

Peak 1 – diosgenin peak

В отчёте программы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсэнд» (Россия), площадь пика диосгенина составила 833,47 mAU · c.

Линейность методики

Наличие прямо пропорциональной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в образце в пределах диапазона применения (аналитической области) методики.

Для установления линейной зависимости между концентрацией вещества (диосгенина) в растительном экстракте и площадью хроматографического пика проводили статистическую обработку выборки, полученной в результате количественных анализов на 5 уровнях концентрации. Для определения линейности

в соответствии с методом наименьших квадратов проводили хроматографирование в аналогичных условиях 5 растворов РГСО с концентрациями в диапазоне от 62,5 мкг/мл до 1000 мкг/мл.

Н. А. Эпштейн [5] рекомендует в рамках валидации методики количественного определения по показателю «линейность» использовать не менее 5 градуировочных растворов (не менее 5 точек) с коэффициентом корреляции К. Пирсона (r^2) не менее 0,995.

По результатам хроматографического анализа строили график градуировочной зависимости отношения площадей пиков растворов РГСО диосгенина к их концентрациям. Исходные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Переменные градуировочных растворов диосгенина в диапазоне концентраций 62,5–1000 мкг/мл

Table 5. Variables of diosgenin calibration solutions in the range concentrations of 62.5–1000 micrograms/ml

№ раствора № solution's	Концентрация раствора, мкг/мл The concentration of the solution, µg/ml	Площадь пика раствора, mAU · c Solution peak area, mAU · c
1	62,5	340,28
2	125	1091,12
3	250	2396,14
4	500	6543,26
5	1000	14165,43

График линейной зависимости строили при помощи программы Microsoft Excel 2016 (Microsoft Inc., США) (рисунок 3).

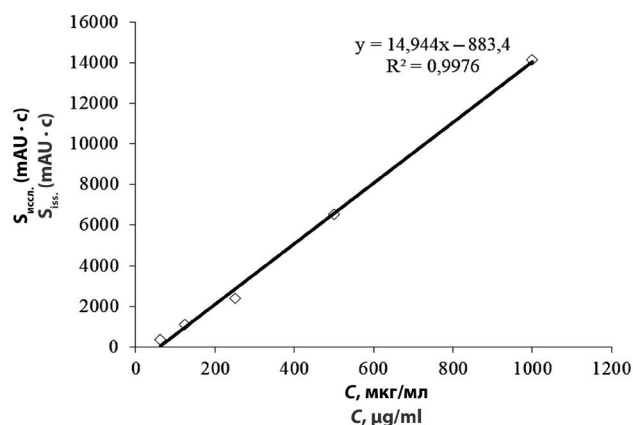


Рисунок 3. График линейной зависимости концентрации от площадей пика стандартных образцов диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл

Figure 3. Graph of linear dependence of the concentration on the peak areas of standard diosgenin samples in the concentration range from 62,5 to 1000 mcg/ml

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при линейной зависимости $Y = b \times X + a$, представлены в таблице 6.

Статистические параметры рассчитывались при помощи программы «Stata MP 15.0» (Stata Inc., США).

Таблица 6. Результаты линейного регрессионного анализа стандартных растворов диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл в программе «Stata MP 15.0»

Table 6. Results of linear regression analysis of standard diosgenin solutions in the concentration range from 62,5 to 1000 mcg/ml in the program «Stata MP 15.0»

Статистический параметр Statistical parameter	Результат Result
Уравнение линейной регрессии Linear Regression Equation	$Y = 14,944X - 883,4$
Угловой коэффициент линейной регрессии, b Slope of linear regression, b	14,944 (95 % ДИ = 13,587–16,29977) 14,944 (95 % CI = 13,587–16,29977)
Свободный член линейной регрессии, a Free term of linear regression, a	–883,4 (95 % ДИ = –1583,382–(–183,411)) –883,4 (95 % CI = –1583,382–(–183,411))
Среднее значение массы навески, г Average weight of the sample, g	0,0001
Среднее значение критерия Стьюдента $t_{\text{табл.}}$ (P = 95 %, f = n – 1 = 5 – 1 = 4) Average value of Student's test $t_{\text{табл.}}$ (P = 95 %, f = n – 1 = 5 – 1 = 4)	–4,02
Коэффициент детерминации (R-squared) или коэффициент корреляции Coefficient of determination (R-squared) or correlation coefficient	0,9976
Коэффициент детерминации скорректированный (Adj R-squared) или коэффициент корреляции скорректированный Adj R-squared or Correlation Coefficient	0,9968
Ошибка стандартного отклонения Standard deviation error	324,89

Исходя из построенного графика рисунка 3 коэффициент корреляции (r^2) составляет 0,9976, а уравнение кривой имеет вид $Y = 14,944X - 883,4$. Следовательно, по полученным данным можно судить о линейности данной методики в диапазоне концентраций 62,5–1000 мкг/мл.

Аналитическая область методики (диапазон применения). В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность. В рамках данного диапазона концентраций от 80 до 120 % была доказана линейность, правильность и прецизионность методики.

Приведённая методика прошла валидацию и соответствует требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XIV издания по показателям «правильность», «прецизионность», «специфичность» и «линейность».

ЛИТЕРАТУРА

1. Stekolshchikova E. A., Stavrianidi A. N., Porotova A., Rodin I., Shpigun O. Combination of HPLC–MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;132:87–92. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.09.041.
2. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova, E. A., Turova, P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography–mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*, 2017. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017;72:144–153. DOI: 10.3103/S0027131417030063.
3. Choi S. J. et al. Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope platyphylla*. *Journal of separation science*. 2015;38(1):18–24. DOI: 10.1002/jssc.201401007.
4. Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi A., Shpigun O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.
5. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

REFERENCES

1. Stekolshchikova E. A., Stavrianidi A. N., Porotova A., Rodin I., Shpigun O. Combination of HPLC–MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;132:87–92. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.09.041.
2. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova, E. A., Turova, P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography–mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*, 2017. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017;72:144–153. DOI: 10.3103/S0027131417030063.
3. Choi S. J. et al. Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope platyphylla*. *Journal of separation science*. 2015;38(1):18–24. DOI: 10.1002/jssc.201401007.
4. Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi A., Shpigun O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.
5. Epstein N. A. Validation of analytical methods: graphical and computational criteria for evaluating the linearity of methods in practice. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

Москва, 25 ноября 2020
Moscow, 25 November 2020



RUDN
university



The III International scientific conference
«PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT»

III Международная научно-практическая конференция
«ГАРМОНИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ»

pharmdevelopment.rudn.ru



PharmDevelopment@pfur.ru

посвящена памяти профессора В.В.Чистякова

Конференция при участии ведущих отечественных и зарубежных ученых в области фармацевтической разработки, аналитики и контроля качества продукции фармацевтической и пищевой промышленности, а также при участии профильных министерств и ведомств РФ

КЛЮЧЕВЫЕ ТЕМЫ:

- Интеграция образования, бизнеса и науки: новые научно-образовательные практики и перспективные модели;
- Международная практика фармацевтической разработки;
- Взаимодействие и гармонизация надлежащих практик;
- Фармакогнозия и метаболомика растений в разработке лекарственных средств природного происхождения;
- Роль доклинических и клинических исследований в процессе фармацевтической разработки;
- Современная аналитика в научных исследованиях и оценке соответствия в фармацевтической и пищевой областях.

ПРИГЛАШАЕМ ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ

Участие бесплатное

Регистрация и подробная информация на сайте: www.pharmdevelopment.rudn.ru
+7 (499) 739 58 34 PharmDevelopment@pfur.ru

Оригинальная статья/Research article

Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид

Ю. М. Домнина^{1,2*}, В. В. Суслов^{1,2}, Н. Э. Грамматикова^{1,3}, С. А. Кедик^{1,2}

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

2 – АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

3 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе», 119021, Россия, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

*Контактное лицо: Домнина Юлия Михайловна. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Ю. М. Домнина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; В. В. Суслов – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Н. Э. Грамматикова – <https://orcid.org/0000-0003-3508-231X>; С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Статья поступила: 02.09.2020. Статья принята в печать: 08.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Для стандартизации показателей качества в течение предполагаемого срока хранения, разработанного лекарственного препарата налтрексона гидрохлорида в форме назального спрея, содержащего высокую концентрацию полоксамера, а также бензалкония хлорид в качестве консерванта, проведено исследование по микробиологическим показателям. Изучена возможность применения метода мембранной фильтрации при испытании опытных образцов, рекомендованного ГФ XIV.

Цель. Изучение и подбор условий проведения испытаний по показателю «микробиологическая чистота» образцов назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали образцы назального спрея налтрексона гидрохлорида. При анализе микробиологической чистоты применяли метод мембранной фильтрации, рекомендованный в ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. В рамках проведенного исследования установлено, что образцы препарата отвечают требованиям по микробиологическому показателю для препаратов категории 2. Проверка пригодности метода для образцов лекарственной формы показала, что антимикробное действие препарата полностью снимается промыванием фильтра, что доказано посевом индикаторных тест-микроорганизмов, количественный и качественный характер роста, которых не отличался от контроля без препарата.

Заключение. В результате проведенных исследований подобраны и обоснованы оптимальные условия проведения испытаний по показателю «Микробиологическая чистота» для назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид.

Ключевые слова: назальный спрей, налтрексон, микробиологическая чистота, мембранная фильтрация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в планировании и постановке экспериментов, в интерпретации результатов и написании текста статьи. Автор Н. Э. Грамматикова осуществляла проведение экспериментальных исследований. Автор Ю. М. Домнина нарабатывала опытные образцы препарата для исследования.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Грамматикова Н. Э., Кедик С. А. Оценка микробиологической чистоты назального спрея, содержащего налтрексона гидрохлорид. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120>

Microbiological Estimation of Nasal Spray Containing Naltrexone Hydrochloride

Yuliya M. Domnina^{1,2*}, Vasilii V. Suslov^{1,2}, Nataliya E. Grammatikova^{1,3}, Stanislav A. Kedik^{1,2}

1 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

3 – FSBI Gause Institute of New Antibiotics, 11/1, Bolshaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435, Russia

*Corresponding author: Yuliya M. Domnina. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Yuliya M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; Vasilii V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>;

Nataliya E. Grammatikova – <https://orcid.org/0000-0003-3508-231X>; Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>.

Received: 02.09.2020. Revised: 08.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. In order to standardize the quality indicators during the expected shelf life of the developed drug naltrexone hydrochloride in the form of a nasal spray containing a high concentration of poloxamer and benzalkonium chloride as a preservative, a microbiological study was carried out. The possibility of using the membrane filtration method for testing prototypes recommended by the State Pharmacopoeia XIV.

Aim. Study and selection of test conditions for the «microbiological purity» indicator of nasal spray samples containing naltrexone hydrochloride.

Materials and methods. As an object of research, a naltrexone hydrochloride nasal spray was used.

When analyzing the microbiological purity, the membrane filtration method recommended in the State Pharmacopoeia XIV.

Results and discussion. As part of the study, it was found that the samples of the drug meet the requirements for a microbiological indicator for drugs of category 2. Testing the suitability of the method for samples of the dosage form showed that the antimicrobial effect of the drug was completely removed by washing the filter, which was proved by inoculation of indicator test microorganisms, the quantitative and qualitative nature of growth, which did not differ from the control without the drug.

Conclusion. As a result of the studies carried out, the optimal test conditions for the «Microbiological purity» indicator for the nasal spray containing naltrexone hydrochloride were selected and substantiated.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Грамматикова Н. Э., Кедик С. А., 2020

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Grammatikova N. E., Kedik S. A., 2020

Keywords: nasal spray, naltrexone, microbiological purity, membrane filtration.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors were actively involved in planning and setting up the experiments, interpreting the results, and writing the text of the article. Author N. E. Grammatikova carried out experimental research. The author Yu. M. Domnina developed prototypes of the drug for research.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Grammatikova N. E., Kedik S. A. Microbiological estimation of nasal spray containing naltrexone hydrochloride. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-116-120>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных этапов разработки новых препаратов является контроль по микробиологическим показателям, необходимых при изучении стабильности, в процессе хранения или выпуске партии в условиях производства. Кроме того, состав действующих и вспомогательных веществ должен обеспечивать как стандарты качества, так и гарантировать возможность применения стандартных методов испытания, в том числе по микробиологической чистоте.

Разработанный назальный спрей налтрексона гидрохлорид в качестве вспомогательных компонентов содержит высокую концентрацию полоксамера и консервант бензалкония хлорида [1–3].

В соответствии с ГФ XIV [4], назальный спрей относится к категории 2 и должен соответствовать следующим показателям:

- ✓ Общее число аэробных бактерий не более 10^2 КОЕ в 1 г (мл).
- ✓ Общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10^1 в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г (мл).
- ✓ Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г (мл).

В XIV Фармакопее описаны два основных метода контроля микробиологической чистоты для нестерильных лекарственных средств: метод прямого

посева и метод мембранной фильтрации. Опытный образец – спрей назальный, содержащий в качестве консерванта бензалкония хлорид, проявляет активность в отношении широкого спектра микроорганизмов [5]. Для препаратов с антимикробным действием и хорошо растворимых в воде наиболее предпочтителен метод мембранной фильтрации, так как для данного метода не требуется нейтрализации антисептика методом разведения или применение инактиваторов [6]. Однако для каждой нового лекарственного препарата необходимо экспериментально установить пригодность метода.

Целью исследования является изучение условий проведения испытания по показателю «микробиологическая чистота» образцов назального спрея, содержащего в качестве действующего вещества налтрексона гидрохлорид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для анализа использовали назальный спрей налтрексона, состав которого представлен в таблице 1.

Исследуемый препарат представляет собой раствор с термозависимыми свойствами и при повышении температуры от 20 до 35 °С происходит увеличение динамической вязкости от 25 до 60 мПа · с [1].

Фильтрацию осуществляли через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и диамет-

Таблица 1. Состав назального спрея

Table 1. The composition of the nasal spray

Компоненты Components	Производитель Manufacturer	Концентрация, % Concentration, %
Налтрексона гидрохлорид Naltrexone hydrochloride	Aspenn Oss B.V., Нидерланды, серия L00037915 Aspenn Oss B.V., Netherlands, series L00037915	2,5
Полоксамер Kolliphor® P 407 Poloxamer Kolliphor® P 407	Geismar США, № GNA 18721 D, NF-USP/Ph. Eur. Geismar USA, № GNA 18721 D, NF-USP/Ph. Eur.	14,0
Лимонная кислота безводная, х.ч. Anhydrous citric acid, chemically pure	Химмед, Россия, ГОСТ 3652-69 Himmed, Russia, GOST 3652-69	0,01
Натрия хлорид, х.ч. Sodium chloride, chemically pure	Ленреактив, Россия, ГОСТ 4233-77 Lenreaktiv, Russia, GOST 4233-77	0,2
Бензалкония хлорид Benzalkonium chloride	Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., Индия, USP Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP	0,006
Вода очищенная (ФС.2.2.0020.15) Purified water (Ph. monograph.2.2.0020.15)		до 100

ром диска 47 мм (Millipore, США) на установке, состоящей из колбы Бунзена, фильтродержателя со стаканом, вакуум-нагнетательного насоса при комнатной температуре.

В работе использованы штаммы тест-микроорганизмов, которые были получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ): *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Aspergillus brasiliensis* (*A. niger*) ATCC 9642 (BKM F1119), *Candida albicans* ATCC 10231.

Для анализа применяли следующие питательные среды и растворы: триптон-соевый агар сухой (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); цетримидный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); пептон сухой ферментативный (ГОСТ 13805-76); агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); Бульон Мосселя (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); Sabouraud 4 % Glucose Agar (Sigma-Aldrich, Индия, Lot BCCB7065); соево-казеиновая среда жидкая (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); полисорбат-80 (твин-80) (OLEON, Бельгия).

В работе использовали промывные жидкости № 1 и №2, приготовленные в соответствии с ГФ XIV [4].

Подготовка тест-микроорганизмов

Бактериальные тест-штаммы сохраняли при температуре -75°C в триптиказо-соевом бульоне, содержащем 15 % глицерина. Для активации бактериальные тест-микроорганизмы высевали на триптон-соевую агаризованную среду. Инкубацию проводили в течение ночи (около 18 часов) при температуре $(32,5 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$. Грибные тест-штаммы активировали на Сабуро агаре при температуре $(22,5 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$. *C. albicans* в течение 48 часов, *A. brasiliensis* в течение 5–7 суток до образования спорующего воздушного мицелия.

Для анализа антимикробного действия лекарственной формы бактериальные тест-культуры и *A. brasiliensis* разводили в фосфатно-солевом буферном растворе с натрием хлорида и пептоном (pH 7,0) до титра 10^2 КОЕ/мл. Филаментозный тест-микроорганизм *A. brasiliensis* после 5 суток инкубации (до формирования плотного воздушного мицелия и спорообразования) смывали с агара Сабуро фосфатным буфером, содержащим 0,05 % твина-80, определяли количество конидий и спор в 1 мл раствора с использованием камеры Горяева.

Далее суспензии всех тест-штаммов разводили 1:10 до титра около 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Подготовка образцов для испытания на наличие антимикробного действия

Для определения антимикробного действия 10 мл спрея назального вносили в 100 мл разбавителя (жидкость № 2), тщательно перемешивали (разведение 1:10). Полученный раствор последовательно разводили 1:20, 1:50, 1:100 и 1:500, переносили по 1 мл в чашки Петри и заливали агаризованной средой инокулиро-

ванной тест-микроорганизмами. Анализ осуществляли в отношении тест-культур *B. cereus* ATCC 10702 и *S. aureus* ATCC 6538, к которым препарат проявляет максимальную активность.

Методика определения минимальной подавляющей концентрации

Чувствительность тест-микроорганизмов к об-разцу спрея изучали микрометодом двукратных серийных разведений в бульоне. Анализ осуществляли в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований.

Для постановки эксперимента в первые лунки планшета вносили препарат в питательной среде в количестве 50 мкл для бактериальных культур и 100 мкл, для грибных культур. Диапазон изучаемых концентраций бензалкония хлорида в препарате составлял от 30 до 0,23 мг/мл. Для контроля роста в 3 ячейки вносили 50 мкл инокулята без препарата («контроль роста»).

Подготовленные планшеты инкубировали в режиме $(32,5 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$ для бактериальных культур и *Candida*, $(22,5 \pm 2,5)^{\circ}\text{C}$ для *A. brasiliensis*.

Методика определения микробиологической чистоты для назального спрея налтрексона гидрохлорида

Образцы исследуемого препарата в количестве 10 мл растворяли в 100 мл жидкости № 1 [4]. Далее 10 мл полученного раствора переносили в стакан с фильтродержателем, содержащего 50 мл жидкости над мембраной. Включали насос и осуществляли фильтрацию, оставляя около 10 мл перед каждым промыванием фильтра. Промывную жидкость вносили порциями по 50 мл. Общий объем промывной жидкости составил 300 мл. Процедуру повторяли на новом фильтре в соответствии с задачей исследования. Промытые фильтры снимали с фильтродержателя стерильным пинцетом и накладывали на соответствующие агаризованные среды для анализа наличия аэробных микроорганизмов и грибов, а также погружали в накопительный соево-казеиновый бульон для анализа отдельных видов микроорганизмов. Соево-казеиновый бульон инкубировали 24–48 часов, по истечении времени пересевали на селективные среды.

Проверка пригодности метода мембранной фильтрации

Фильтрацию осуществляли в соответствии с методикой определения микробиологической чистоты, добавляя в последнюю порцию промывной жидкости по 10 мл взвеси тест-микроорганизмов (каждого на отдельный фильтр) в титре около 10 КОЕ/мл.

Фильтры помещали на соответствующие питательные среды: на триптон-соевый агар – *B. cereus* ATCC 10702; на агар Сабуро – *A. brasiliensis* BKM F1119;

в соево-казеиновый бульон – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Посевы инкубировали при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ для бактериальных культур, $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ для *A. brasiliensis* в течение 1–5 суток.

По окончании времени инкубации из флаконов с инокулированными тест-микроорганизмами мембранами производили высев для морфологического анализа выросших тест-микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 на маннитно-солевой агар, *E. coli* ATCC 25922 в бульон Мосселя, через 24 часа инкубации на агар Эндо, *P. aeruginosa* ATCC 9027 на цетримидный агар, *A. brasiliensis* BKM F 1119 на агар Сабуро.

Чашки с агаризованной питательной средой Сабуро инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 24–72 часов, чашки с бактериальными культурами при $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение ночи.

По окончании инкубации проводили визуальную оценку роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Риски микробной контаминации в процессе производства, хранения или применения лекарственного средства могут значительно изменить качество препарата, срок годности и как следствие его безопасность. Добавление консервантов в состав лекарственного препарата позволяет минимизировать эти риски.

Известно, что эффективность бензалкония хлорида зависит от концентраций модификаторов вязкости [7]. Учитывая, что в состав исследуемого препарата входит полоксамер 407, который при повышении температуры от 20 до 35 °C приводит к значительному увеличению динамической вязкости, необходимо изучить антимикробное действие состава и возможность его устранения для дальнейшего подбора условий оценки микробиологической чистоты препарата.

Содержание бензалкония хлорида в лекарственной форме составляет 60 мкг/мл. Значения минимальной подавляющей концентрации этого консерванта в отношении тест-микроорганизмов соответствуют (мкг/мл): *A. brasiliensis* BKM F-1119 – 16,0; *C. albicans* ATCC 10231 – 8,0; *E. coli* ATCC 25922 – 4,0; *P. aeruginosa* ATCC 9027 – $\geq 30,0$; *B. cereus* ATCC 10702 – 1,0; *S. aureus* ATCC 6538 – 0,5.

При анализе по показателю «Микробиологическая чистота» необходимо нейтрализовать антимикробное действие вспомогательных компонентов. При исследовании снятия антимикробной активности применяли метод разведения с использованием разбавителя жидкость № 2, содержащий в качестве неспецифического инактиватора твин-80 (3 %), рекомендованный ГФ XIV [4].

Как показывают результаты эксперимента, при росте в агаризованной среде, тест-культуры проявляют чувствительность, даже с учетом разбавления препарата с использованием инактивирующего агента.

Рост тест-микроорганизма *B. cereus* ATCC 10702 не достигал контроля в разведении 1:200. После 48 часов инкубации в этом разведении количество жизнеспособных

клеток в среднем составило 6,5 КОЕ, в то время как в контроле без препарата этот показатель составил 11,5 КОЕ (рисунок 1).

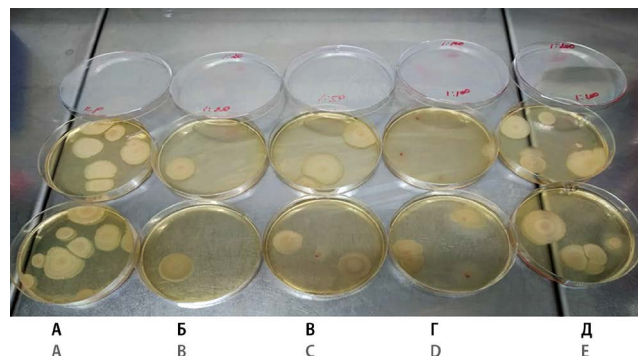


Рисунок 1. Проверка антимикробного действия в отношении *B. cereus* ATCC 10702:

А – контроль; Б – разведение 1:20; В – разведение 1:50; Г – разведение 1:100; Д – разведение 1:200

Figure 1. Checking the antimicrobial action against *B. cereus* ATCC 10702:

А – control; Б – dilution 1:20; В – dilution 1:50; Г – dilution 1:100; Д – dilution 1:200

При установленных нормах допустимого содержания аэробных микроорганизмов (не более 100), метод прямого посева с использованием в качестве инактиватора раствора 3 % твина-80 не приемлем для данного анализа. Кроме того, с учетом минимальной подавляющей концентрации в отношении грибных культур, для исследования их наличия необходимо разведение не менее 1:10 при допустимом содержании в лекарственной форме не более 10 КОЕ/мл, что также затрудняет получение достоверных результатов. Так как препарат проявляет высокую активность к грамположительным микроорганизмам, а также в меньшей степени, но активен в отношении грамотрицательных и грибных культур, для анализа микробиологической чистоты препарата исследовали возможность применения метода мембранной фильтрации (рисунки 2 и 3). Учитывая, что все компоненты, входящие в экспериментальный образец хорошо растворимы в воде, для испытания не требуется применять инактивирующих агентов. Результаты исследования возможности применения мембранной фильтрации показали, что промывка жидкостью № 1 в объеме 300 мл обеспечивает удаление препарата с мембраны и тем самым снимает антимикробное действие консерванта. Рост *B. cereus* и *A. brasiliensis* не отличался от контрольных вариантов, не содержащих препарат, количество колониеобразующих единиц соответствовало расчетному значению в посевной суспензии.

Для определения наличия отдельных видов бактерий: семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*, испытание включает использование среды для предварительной инкубации, а также селективных и дифференциально-диагностических питательных сред.

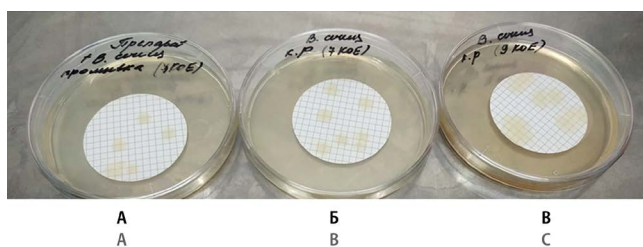


Рисунок 2. Проверка пригодности мембранной фильтрации для контроля по показателю «Микробиологическая чистота» спрея назального.

A – мембрана с препаратом после промывки инокулирована тест-культурой *B. cereus* ATCC 10702 – 7 КОЕ; Б – контрольная мембрана после фильтрации промывной жидкости без препарата, инокулирована в том же титре – 7 КОЕ; В – контрольная мембрана после фильтрации промывной жидкости без препарата, инокулирована в том же титре – 9 КОЕ

Figure 2. Checking the suitability of membrane filtration to control the «Microbiological purity» of the nasal spray.

A – the membrane with the preparation after washing was inoculated with a test culture of *B. cereus* ATCC 10702 – 7 CFU; B – control membrane after filtration of washing liquid without preparation, inoculated in the same titer – 7 CFU; C – control membrane after filtration of washing liquid without preparation, inoculated in the same titer – 9 CFU

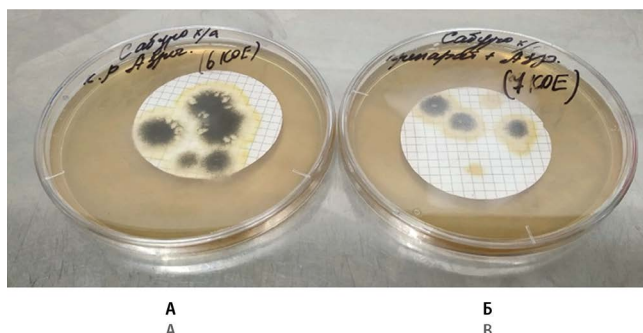


Рисунок 3. Проверка пригодности мембранной фильтрации.

A – контрольная мембрана после промывной жидкости без препарата инокулирована тест-культурой *A. brasiliensis* VKM F 1119 (6 КОЕ); Б – мембрана после промывки препарата с последней порцией внесена тест-культура (7 КОЕ)

Figure 3. Checking the suitability of membrane filtration.

A – the control membrane after washing liquid without the preparation was inoculated with the *A. brasiliensis* VKM F 1119 test culture (6 CFU); B – the membrane after washing the preparation, the test culture (7 CFU) was added with the last portion

В соответствии с этим проводили исследование на возможность выявления *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* в 1 грамме. Каждую культуру микроорганизма наносили на мембрану с последней порцией промывной жидкости после фильтрации препарата в разбавителе, мембрану погружали в соево-казеиновый питательный бульон. По истечении времени инкубации пересеивали на соответствующие селективные среды.

В ходе исследования пригодности мембранной фильтрации для анализа присутствие в лекарственной форме отдельных видов микроорганизмов показало,

что для устранения антимикробного действия консерванта для промывки мембраны с образцом достаточно 300 мл жидкости № 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что препарат спрей назальный проявляет антимикробную активность в отношении *Bacillus cereus* ATCC 10702 в разведении 1:200 (МПК 1 мкг/мл) и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 в разведении 1: 200 (МПК 0,5 мкг/мл).

Методом мембранной фильтрации осуществлен анализ опытных образцов спрея назального по показателю «Микробиологическая чистота». В рамках проведенного исследования установлено, что образцы препарата отвечают требованиям по микробиологическому показателю для препаратов категории 2 в соответствии с ГФ XIV [4]. Проверка пригодности метода мембранной фильтрации для опытных образцов лекарственной формы показала, что антимикробное действие полностью снимается при промывании 300 мл жидкости № 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора вспомогательных компонентов назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;4:73–77.
2. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Разработка назального спрея Налтрексона гидрохлорида. *Научный форум: Медицина, биология и химия*. 2018. С. 69–73.
3. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора загустителя назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Сборник тезисов*.
4. ГФ XIV ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота».
5. Sandle T., Skinner K., Yeandle E. Optimal conditions for the recovery of bioburden from pharmaceutical processes: a case study. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. 2013;18(3):84–90.
6. Яремчук А. А., Хишова О. М., Половко Н. П. Микробиологическое обоснование использования бензалкония хлорида в мягкой лекарственной форме для наружного применения. *Вестник фармации*. 2012;2:9–45.
7. Jira T., Panzig B., Pohloudek-Fabini R. Antimicrobial activity of benzalkonium chloride in potential contact lens fluids. *Pharmazie*. 1982;37(8):587–90.

REFERENCES

1. Domnina Y.M., Kedik S.A., Suslov V.V., Shnyak E.A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;4:73–77. (In Russ.).
2. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E.A. Development of Naltrexone Hydrochloride Nasal Spray. *Nauchnyy forum: Meditsina, biologiya i khimiya*. 2018. P. 69–73. (In Russ.).
3. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Rationale for the choice of naltrexone hydrochloride nasal spray thickener. *Sbornik tezisov*. (In Russ.).
4. GF XIV OFS 1.2.4.0002.18 «Mikrobiologicheskaya chistota» (In Russ.).
5. Sandle T., Skinner K., Yeandle E. Optimal conditions for the recovery of bioburden from pharmaceutical processes: a case study. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. 2013;18(3):84–90.
6. Yaremchuk A. A., Khishova O. M., Polovko N. P. Microbiological rationale for the use of benzalkonium chloride in a soft dosage form for external use. *Vestnik farmatsii*. 2012;2:39–45. (In Russ.).
7. Jira T., Panzig B., Pohloudek-Fabini R. Antimicrobial activity of benzalkonium chloride in potential contact lens fluids. *Pharmazie*. 1982;37(8):587–90.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-121-127>
УДК 615.072



Оригинальная статья/Research article

Количественное определение бензалкония хлорида в составе назального спрея налтрексона гидрохлорида

Ю. М. Домнина^{1,2*}, В. В. Суслов^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}, Е. В. Ворфоломеева^{1,2}, А. В. Мелешко^{1,2}

1 – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (ПТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86
2 – АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

*Контактное лицо: Домнина Юлия Михайловна. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Ю. М. Домнина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; В. В. Суслов – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>;
Е. В. Ворфоломеева – <https://orcid.org/0000-0002-4256-5646>; А. В. Мелешко – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>.

Статья поступила: 23.09.2020. Статья принята в печать: 26.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Бензалконий хлорид широко используют в качестве консерванта в лекарственных средствах. Для количественного определения бензалкония хлорида часто используют хроматографические методики, описанные в Европейской и Американских фармакопеях. В них используют нитрильный сорбент. Однако в целях унификации методик и упрощения технологии контроля качества в процессе производства целесообразно адаптировать методики для определения основного компонента.

Цель. Разработать методику количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее, содержащем термочувствительный полимер полоксамер 407 и провести ее валидацию.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали назальный спрей налтрексона гидрохлорида. Использовали жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) с диодно-матричным детектором.

Результаты и обсуждение. В работе изучена возможность применения ранее разработанной методики количественного определения бензалкония хлорида в составе назального спрея. На основании полученных результатов внесены изменения в методику количественного определения бензалкония хлорида.

Заключение. В результате проведенных исследований подобраны наиболее приемлемые условия пробоподготовки назального спрея для количественного определения консерванта. Разработанная методика предусматривает условия хроматографирования ранее применяемые для определения налтрексона гидрохлорида, что позволяет максимально эффективно использовать оборудование в процессе анализа готового лекарственного средства. Проведена валидация методики и доказаны ее специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Ключевые слова: назальный спрей, налтрексон, бензалкония хлорид, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, градиентный режим.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали участие в обсуждении и планировании эксперимента, обработке полученных результатов, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В. Количественное определение бензалкония хлорида в составе назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-121-127>

Quantitative Determination of Benzalconium Chloride in the Naltrexone Hydrochloride Nasal Spray

Yuliya M. Domnina^{1,2*}, Vasily V. Suslov^{1,2}, Stanislav A. Kedik^{1,2}, Elena V. Vorfolomeeva^{1,2},
Anastasiya V. Meleshko^{1,2}

1 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia
2 – JSC «Institute of Pharmaceutical Technologies», 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

*Corresponding author: Yuliya M. Domnina. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Yuliya M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; Vasily V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>;
Elena V. Vorfolomeeva – <https://orcid.org/0000-0002-4256-5646>; Anastasiya V. Meleshko – <https://orcid.org/0000-0002-1073-5073>.

Received: 23.09.2020. Revised: 26.10.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Benzalconium chloride is widely used as a conservation agent in medicines. For quantitative determination, the methods described in the European and American Pharmacopoeias by chromatography using columns with nitrile sorbent are often used. However, in order to unify the methods and simplify the quality control technology in the production process, it is advisable to adapt the existing methods for new goals and objectives.

Aim. To develop a method for the quantitative determination of benzalconium chloride in a nasal spray containing a thermosensitive polymer Poloxamer 407 and validate it.

Materials and methods. As an object of research, a naltrexone hydrochloride nasal spray was used. The quantitative determination of naltrexone in the test sample was developed using a Dionex UltiMate 3000 high-performance liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific, USA) equipped with a diode-matrix detector.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В., 2020

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V., 2020

Results and discussion. The paper explored the possibility of using an earlier developed method for the quantitative determination of naltrexone hydrochloride for the quantitative determination of benzalkonium chloride in the composition of a nasal spray. Based on the results obtained, changes were made to the quantitative determination method, and the sample preparation of the samples under study was adapted.

Conclusion. As a result of the studies carried out, the most acceptable conditions for the preparation of the nasal spray for the quantitative determination of the preservative were selected. The developed technique provides for the chromatographic conditions previously used for the determination of naltrexone hydrochloride, which makes it possible to use the equipment as efficiently as possible in the analysis of the finished drug. The method has been validated and its specificity, linearity, correctness and precision have been proven.

Keywords: nasal spray, naltrexone, high-performance liquid chromatography, validation, gradient mode.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took part in the discussion and planning of the experiment, processing of the results obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V. Quantitative determination of benzalkonium chloride in the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-121-127>

ВВЕДЕНИЕ

Бензалкония хлорид представляет собой смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, алкильная группа которых имеет разные длины алкильных цепей и широко применяется в качестве консерванта в лекарственных средствах. Его частое применение обусловлено значительным спектром антимикробной активности, а также хорошей растворимостью в воде.

Бензалконий хлорид в препаратах наиболее часто определяют методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии в изократическом режиме [1–4]. В виду наличия высокомолекулярного соединения в составе назального спрея «Налтрексон, спрей назальный» нами был разработан метод количественного определения налтрексона гидрохлорида в градиентном режиме [5].

Цель работы заключалась в проверке пригодности ранее разработанной методики количественного определения налтрексона гидрохлорида в назальном спрее для анализа бензалкония хлорида в составе лекарственной формы. Разработке, при необходимости, и валидации скорректированной методики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Назальный спрей налтрексона гидрохлорида, имеющий следующий состав: налтрексона гидрохлорид (2,5 г); полоксамер (14,0 г); лимонная кислота (0,01 г); натрия хлорид (0,2 г); бензалкония хлорид (0,006 г); вода очищенная до 100,0 г.

Оборудование

Высокоэффективный жидкостный хроматограф Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) оснащенный диодно-матричным детектором, с использованием колонки Kinetex XB C18 (250 × 4,6 мм с диаметр частиц 5 μm, размер пор 100 Å) (Phenomenex, США).

Установка для фильтрования Millipore (Merck, США).

Используемые реактивы

Бензалкония хлорид (Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP); 1-пентилсульфонат натрия (Panreac, кат. 245-208-4); ортофосфорная кислота (Fluka, кат. 79606); ацетонитрил (Panreac, HPLC-gradient grade, кат. 200-835-2).

Метод ВЭЖХ

Приготовление подвижной фазы А: в мерную колбу вместимостью 500 мл помещали 435 мг натрия 1-пентилсульфоната, 300 мл воды для хроматографии, растворяли соль, затем добавляли 5 мл кислоты ортофосфорной концентрированной и доводили водой для хроматографии до метки.

В качестве фазы В использовали ацетонитрил для хроматографии.

Приготовление растворителя образцов (А:В = 86 : 14 %) об./об. смешивали фазы А и В в заданном соотношении: 86 мл фазы А и 14 мл фазы В.

Приготовление раствора СО бензалкония хлорида: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 75,0 мг (точная навеска) СО бензалкония хлорида, растворяли растворителем, доводили до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

Приготовление раствора назального спрея налтрексона гидрохлорида [5]: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл назального спрея, объем раствора доводили до метки растворителем и перемешивали. Затем полученный раствор объемом 10 мл фильтровали через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора назального спрея для анализа бензалкония хлорида по разработанной методике: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 5,0 мл назального спрея, объем раствора доводили до метки растворителем и перемешивали. Полученный раствор объемом 10 мл фильтровали

через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора плацебо: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2,5 г налтрексона гидрохлорида, 14,0 г полоксамера Kolliphor® P 407, 0,01 г лимонной кислоты безводной, 0,2 г натрия хлорида, приливали 70 мл холодной воды очищенной и оставляли при постоянном перемешивании при температуре 4–7 °С на 5–6 часов. Затем доводили до метки водой очищенной и перемешивали.

Приготовление раствора плацебо для анализа: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 5,0 мл раствора плацебо, доводили до метки растворителем, перемешивали и фильтровали полученный раствор через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

Анализ бензалкония хлорида проводили на колонке Phenomenex Kinetex XB C18 250 × 4,6 мм с диаметром частиц 5 мкм и размером пор 100 Å. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Рабочая длина волны 208 нм, температура колонки 25 °С. Испытуемый образец вводили объемом 10,0 мкл. Осуществляли элюирование в градиентном режиме по следующей схеме: 0 мин – 14 % В; 7 мин – 14 % В; 13 мин – 60 % В; 20 мин – 90 % В; 21 мин – 14 % В; 26 мин – 14 % В.

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, последовательно вводили не менее 5 раз раствор бензалкония хлорида для анализа. На хроматограммах идентифицировали пики бензалкония хлорида и определяли их суммарную площадь. Бензалкония хлорид, в данных условиях, хроматографируется в виде двух пиков гомологичных соединений с длиной углеводородной цепи 12 и 14 атомов углерода, имеющих время удерживания около 18,7 и 20,7 мин соответственно. Оценка пригодности хроматографической системы приводится для пиков раствора СО бензалкония хлорида.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность для пиков бензалкония хлорида на хроматограммах раствора стандартного образца должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;
- относительное среднеквадратичное отклонение площадей пиков бензалкония хлорида на хроматограммах раствора стандартного образца должна составлять не более 5 %;
- фактор асимметрии для пиков бензалкония хлорида на хроматограммах раствора стандартного образца должен не превышать 1,5.

Расчет

Содержание бензалкония хлорида в жидкой лекарственной форме ($C_{\text{исп}}$, мг/мл жидкой лекарственной формы) определяли по формуле:

$$C_{\text{исп}} = \frac{a_{\text{СО}} \cdot V_{\text{СО}} \cdot S_{\text{исп}} \cdot 50 \cdot P}{1250 \cdot S_{\text{СО}} \cdot V_{\text{исп}} \cdot 100},$$

где $S_{\text{исп}}$, $S_{\text{СО}}$ – усредненные площади пика (по 5 хроматограммам) бензалкония хлорида на хроматограммах раствора назального спрея для анализа и раствора бензалкония хлорида для анализа соответственно; $a_{\text{СО}}$ – навеска рабочего стандартного образца бензалкония хлорида, использованная при приготовлении раствора бензалкония хлорида для анализа, мг; $V_{\text{СО}}$ – аликвота раствора стандартного образца бензалкония хлорида, взятая для второго разбавления, мл; $V_{\text{исп}}$ – аликвота раствора препарата, мл; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оптимизации методик количественного определения налтрексона гидрохлорида и бензалкония хлорида в условиях производства была изучена возможность применения разработанной ранее методики определения налтрексона гидрохлорида для количественного определения бензалкония хлорида в той же лекарственной форме. Для этого хроматографировали раствор бензалкония хлорида с концентрацией 0,01 мг/мл. В данных условиях бензалконий хлорид выходил в виде двух пиков гомологичных соединений длиной углеводородной цепи 12 и 14 атомов углерода со временами удерживания 18,7 и 20,7 мин соответственно (рисунок 1).

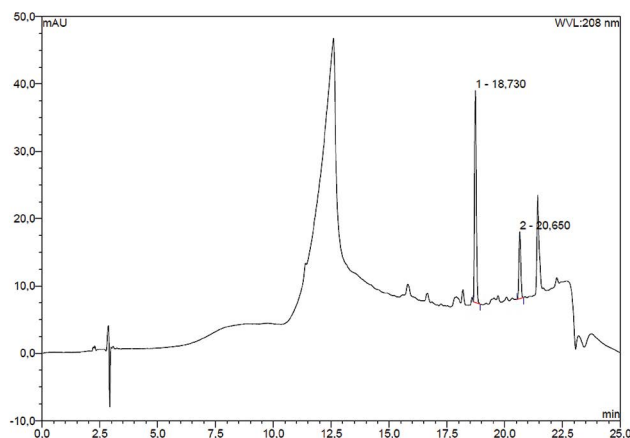


Рисунок 1. Хроматограмма раствора бензалкония хлорида

Figure 1. Chromatogram of a solution of benzalkonium chloride

При анализе образца спрея, подготовленного в соответствии с методикой [5], не удалось идентифицировать пики бензалкония хлорида, поэтому был установлен его предел количественного обнаружения (ПКО).

Для оценки ПКО в условиях проведения анализа применили метод расчета по величине стандартного отклонения аналитического сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика в соответствии с формулой (1):

$$\text{ПКО} = 10 \cdot \frac{S}{b}, \quad (1)$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – тангенс угла наклона калибровочного графика.

Так как ПКО составил 0,00195 мг/мл, то при проведении пробоподготовки согласно методике [5] невозможно определить количественное содержание бензалкония хлорида. Из этих результатов следует, что совместное определение бензалкония хлорида и налтрексона гидрохлорида невозможно. Также невозможно в условиях данной пробоподготовки провести отдельно количественное определение бензалкония хлорида. Следовательно, необходимо изменить процедуру пробоподготовки с учетом ПКО. Разведение необходимо осуществить таким образом, чтобы концентрация бензалкония хлорида попадала в диапазон концентраций выше ПКО и при этом минимизировать действие полимерного компонента на колонку. В соответствии с этим максимальное разведение при значениях ПКО 0,00195 мг/мл и исходной концентрации бензалкония хлорида 0,06 мг/мл не должно превышать 30,7 раз. С другой стороны, для предотвращения выхода из строя рабочих узлов хроматографа за счёт термореверсивных свойств исследуемого образца необходимо снизить концентрацию полимера. Для того чтобы нивелировать негативное влияние полимера и обеспечить высокую эффективность при анализе исследуемых образцов было предложено использовать десятикратное разбавление.

Исходя из вышеизложенного, был модифицирован процесс пробоподготовки: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 5,0 мл назального спрея, объем раствора доводили до метки растворителем и перемешивали. Затем полученный раствор объемом 10 мл фильтровали через мембранный фильтр из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм.

С целью подтверждения пригодности методики для количественного определения бензалкония хлорида была проведена валидация в соответствии с требованиями ГФ XIV [6] по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная сходимост).

Специфичность подтверждали на основе сравнения результатов хроматографирования растворителя (рисунок 2), раствора назального спрея, не содержащего бензалкония хлорида («плацебо») (рисунок 3), раствора СО бензалкония хлорида (рисунок 4), раствора назального спрея для анализа (рисунок 5).

На представленных выше хроматограммах растворителя и «плацебо» (рисунки 2–3) нет пиков, препятствующих определению бензалкония хлорида. Пики, соответствующие бензалконию хлориду на хроматограмме раствора назального спрея для анализа (рисунок 5), имеют такое же время удерживания, как

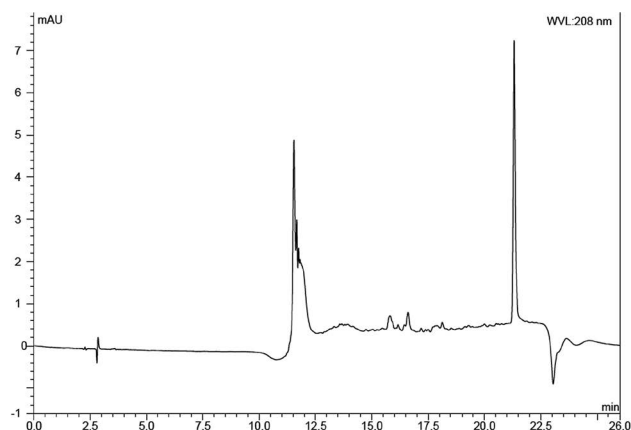


Рисунок 2. Хроматограмма растворителя

Figure 2. Chromatogram of solvent

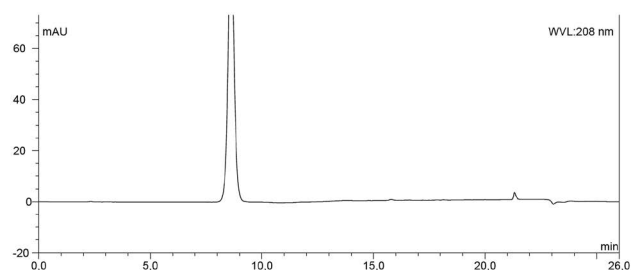


Рисунок 3. Хроматограмма «плацебо»

Figure 3. Chromatogram of placebo

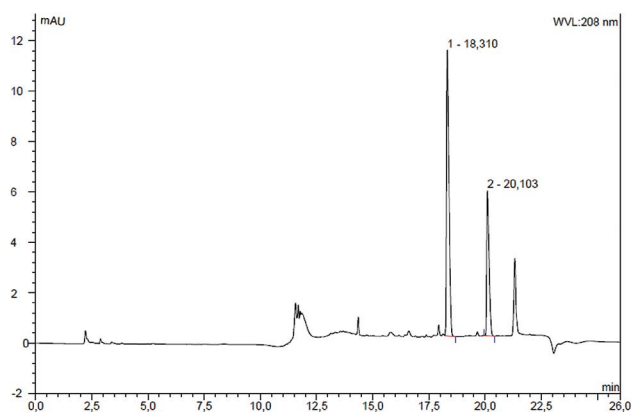


Рисунок 4. Хроматограмма раствора СО бензалкония хлорида

Figure 4. Chromatogram of RS Benzalconium chloride solution

пики на хроматограмме раствора СО бензалкония хлорида (рисунок 4).

Исходя из номинального содержания бензалкония хлорида в назальном спрее составляющей 0,006 мг/мл, аналитическая область методики находится в диапазоне 0,0048–0,0072 мг/мл. Линейность методики была проверена при анализе пяти концентраций, находящихся в аналитической области (0,0048; 0,0054; 0,006; 0,0066; 0,0072 мг/мл) (таблица 1, рисунок 6).

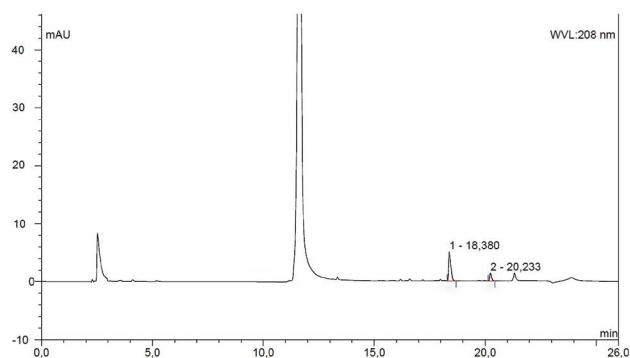


Рисунок 5. Хроматограмма раствора назального спрея

Figure 5. Chromatogram of nasal spray solution

Таблица 1. Валидация методики количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее по параметру линейности

Table 1. Validation of the method for the quantitative determination of benzalkonium chloride by nasal spray according to the linearity parameter.

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Расчетное содержание бензалкония хлорида, мг/мл Estimated content of benzalkonium chloride, mg/ml	Сумма площадей пиков, mAU · с Sum of peak areas, mAU · s
80	0,0048	212,36
80	0,0048	212,28
90	0,0054	230,78
90	0,0054	230,29
100	0,0060	259,66
100	0,0060	259,52
110	0,0066	284,47
110	0,0066	285,53
120	0,0072	301,48
120	0,0072	301,27
Статистические характеристики Statistical characteristics	Результаты Results	Критерии приемлемости Eligibility criteria
Уравнение регрессионной прямой Regression line equation	$y = 38762x + 25,193$	$y = bx + a$
Коэффициент корреляции R Correlation coefficient R	0,9959	≥0,99

Визуальная линейность графика на рисунке 6 и величина коэффициента корреляции $R = \sqrt{0,9918} = 0,9959$ удовлетворяют требованиям критерия линейности. Линейность методики установлена.

Оценку методики по параметру правильность осуществляли следующим образом. Проводили количественное определение бензалкония хлорида в назальном спрее. Методом добавок готовили 9 растворов охватывающих диапазон концентраций 80–120 % (с шагом 20 %, по три раствора на каждый уровень концентрации) от количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее. Оценку

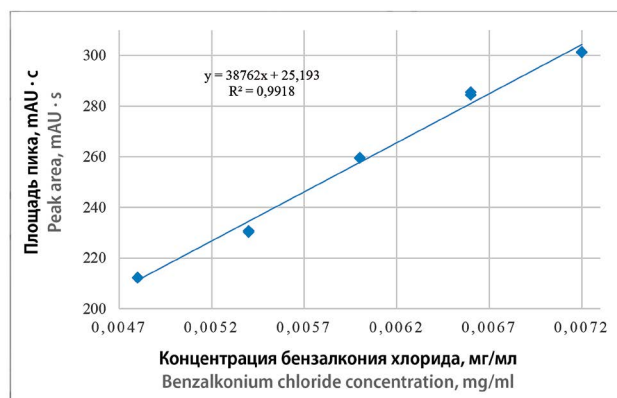


Рисунок 6. Зависимость суммарной площади пиков бензалкония хлорида от его концентрации

Figure 6. Graphical display of the Linearity parameter

проводили сравнением определенного содержания с известным содержанием вещества (фактор отклика). По результатам анализа определяли фактор отклика (Q), %:

$$Q = \frac{C_2}{C_1} \cdot 100,$$

где C_1 – известное содержание бензалкония хлорида в анализируемом образце, %; C_2 – определенное содержание бензалкония хлорида в анализируемом образце, %.

Из полученных девяти значений фактора отклика рассчитывали: среднее значение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал. Были предъявлены следующие критерии приемлемости: среднее значение должно находиться в диапазоне 95–105 %; относительное стандартное отклонение ≤3,0 %; доверительный интервал должен включать 100 % значение.

Исходя из таблицы 2 можно сделать вывод, что требования критерия правильности выполнены.

Для оценки критерия прецизионности методики по параметру повторяемость (сходимость) было проанализировано шесть образцов назального спрея налтрексона одним сотрудником лаборатории в течение 1 дня на одном приборе (таблица 3). Для подтверждения внутрилабораторной прецизионности было проанализировано по 6 образцов одной серии назального спрея налтрексона двумя сотрудниками лаборатории в разные дни на разном оборудовании (таблица 4).

Относительное стандартное отклонение не должно превышать 3,0 %. Требования критерия прецизионность по параметру повторяемость (сходимость) выполнены.

Относительное стандартное отклонение по результатам измерений в течение двух дней должно составлять не более 3,0 %. Критерий Фишера составил 1,01 %, что не превышает требуемый диапазон не более 5,05 %. Требования критерия прецизионность по параметру внутрилабораторная прецизионность выполнены.

Таблица 2. Валидация методики количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее по параметру правильность
Table 2. Validation of the method for the quantitative determination of benzalkonium chloride in a nasal spray by the parameter accuracy

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Концентрация бензалкония хлорида в назальном спрее, мг/мл The concentration of benzalkonium chloride in the nasal spray, mg/ml	Концентрация доб., мг/мл Concentration add., mg/ml	Концентрация в испытуемом р-ре, мг/мл Concentration in the test solution, mg/ml	Площади пиков бензалкония хлорида в испытуемом растворе Peak areas of benzalkonium chloride in the test solution	Площади пиков бензалкония хлорида в растворе стандартного образца Peak areas of benzalkonium chloride in standard sample solution	Полученное содержание, мг/мл Received content, mg/ml	Отклик, % Response, %
80	0,0030	0,0018	0,0048	210,47	212,36	0,00478	99,58
	0,0030	0,0018	0,0048	211,63	212,28	0,00481	100,21
	0,0030	0,0018	0,0048	212,02	212,42	0,00482	100,42
100	0,0030	0,0030	0,0060	261,64	259,66	0,00610	101,67
	0,0030	0,0030	0,0060	253,88	259,52	0,00590	98,33
	0,0030	0,0030	0,0060	264,35	260,11	0,00617	102,83
120	0,0030	0,042	0,0072	307,38	301,48	0,00728	101,11
	0,0030	0,042	0,0072	309,31	301,27	0,00733	101,81
	0,0030	0,042	0,0072	301,17	302,16	0,00712	98,89
Статистические характеристики Statistical characteristics				Результаты, % Results, %		Критерии приемлемости Eligibility criteria	
Среднее значение Mean				100,54		95–105	
Относительное стандартное отклонение Relative standard deviation				1,45		≤3,0	
Верхняя граница доверительного интервала (P = 95 %) The upper limit of the confidence interval (P = 95 %)				102,83		Должен включать 100 % значение Must include 100 % value	
Нижняя граница доверительного интервала (P = 95 %) Lower limit of the confidence interval (P = 95 %)				98,33			

Таблица 3. Валидация методики количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее по параметру повторяемость (сходимость)
Table 3. Validation of the method for the quantitative determination of naltrexone benzalkonium chloride nasal spray by the repeatability parameter (convergence)

Номер пробы Sample number	Площадь пика бензалкония хлорида, mAU · с Peak area of benzalkonium chloride, mAU · s	Содержание бензалкония хлорида в жидкой лекарственной форме, мг/мл Benzalkonium chloride content in liquid dosage form, mg/ml
1	260,12	0,00606
2	259,13	0,00604
3	258,65	0,00602
4	258,16	0,00601
5	257,16	0,00598
6	258,13	0,00601
Статистические характеристики Statistical characteristics		Результаты
Среднее содержание, мг/мл Average content, mg/ml		0,00602
Стандартное отклонение, мг/мл Standard deviation, mg/ml		0,000026
Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %		0,043
Доверительный интервал (P = 95 %), мг Confidence interval (P = 95 %), mg		±0,000027

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили подобрать процедуру пробоподготовки и разработать методику количественного определения бензалкония хлорида в составе назального спрея налтрексона гидрохлорида, содержащего 14,0 % полоксамера 407. Разработанная методика определения бензалкония хлорида унифицирована с методикой количественного определения налтрексона гидрохлорида в составе одного лекарственного препарата. Это позволяет оптимизировать процесс определения количественного содержания компонентов в составе лекарственного средства в условиях производства. Проведена валидация методики и подтверждена ее специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

ЛИТЕРАТУРА

- Жиякова Е. Т., Зинченко А. А., Придачина Д. В., Новиков О. О., Новикова М. Ю. Применение методики ВЭЖХ для анализа бензалкония хлорида в глазных каплях с рабочим названием «Аквавит». *Современные проблемы науки и образования*. 2013;5:633–638.
- Амелин В. Г., Большаков Д. С. Идентификация и одновременное определение четвертичных аммониевых соединений с другими действующими веществами в лекарственных препаратах методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(1):54–60.

Таблица 4. Валидация методики количественного определения бензалкония хлорида в назальном спрее по параметру внутрилабораторная прецизионность

Table 4. Validation of the method for the quantitative determination of benzalkonium chloride in a nasal spray in terms of intermediate precision

Номер пробы Sample number	Сотрудник 1 Employee 1		Сотрудник 2 Employee 2	
	Площадь пика бензалкония хлорида, mAU · с Peak area of benzalkonium chloride, mAU · s	Содержание бензалкония хлорида в единице жидкой лекарственной формы, мг Benzalkonium chloride content per unit of liquid dosage form, mg	Площадь пика бензалкония хлорида, mAU · с Peak area of benzalkonium chloride, mAU · s	Содержание бензалкония хлорида в единице жидкой лекарственной формы, мг Benzalkonium chloride content per unit of liquid dosage form, mg
1	260,12	0,00606	259,81	0,00605
2	259,13	0,00604	257,48	0,00599
3	258,65	0,00602	258,13	0,00601
4	258,16	0,00601	259,14	0,00604
5	257,16	0,00598	257,11	0,00598
6	258,13	0,00601	258,18	0,00601
Статистические характеристики Statistical characteristics				
Среднее содержание, мг Average content, mg		0,00602	0,00601	
Стандартное отклонение, мг Standard deviation, mg		0,0000260	0,0000261	
Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %		0,0432	0,0434	
Доверительный интервал (P = 95 %), мг Confidence interval (P = 95 %), mg		±0,0000273	±0,0000274	
F(5 %; 5; 5) = 5,05			1,01	

- Dudkiewicz-Wilczyńska J., Tautt J., Roman I. Application of the HPLC method for benzalkonium chloride determination in aerosol preparations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(5):909–920. DOI: 10.1016/j.jpba.2003.09.001.
- AlAani H., AlNukkary Y. Determination of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solutions by Stability-Indicating HPLC Method: Application to a Stability Study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(05):080–089. DOI: 10.7324/JAPS.2016.60513.
- Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ворфоломеева Е. В., Мелешко А. В. Количественное определение налтрексона гидрохлорида в назальном спрее методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):98–104.
- ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». С. 276–288.
- Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Vorfolomeeva E. V., Meleshko A. V. Quantitative determination of naltrexone hydrochloride in a nasal spray by high-performance liquid chromatography. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):98–104. (In Russ).
- GF XIV OFS.1.1.0012.15 «Validatsiya analiticheskikh metodik». P. 276–288. (In Russ).

REFERENCES

- Zhilyakova E. T., Zinchenko A. A., Pridachina D. V., Novikov O. O., Novikova M. Yu. Application procedures for hplc analysis benzalconium chloride in eye drops with the working title «AquaVit». *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013;5:633–633. (In Russ.).
- Amelin V. G., Bol'shakov D. S. Identification and simultaneous determination of quaternary ammonium compounds with other active substances in medicinal products by liquid chromatography-mass spectrometry. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(1):54–60. (In Russ).
- Dudkiewicz-Wilczyńska J., Tautt J., Roman I. Application of the HPLC method for benzalkonium chloride determination in aerosol preparations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(5):909–920. DOI: 10.1016/j.jpba.2003.09.001.
- AlAani H., AlNukkary Y. Determination of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solutions by Stability-Indicating HPLC Method: Application to a Stability Study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(05):080–089. DOI: 10.7324/JAPS.2016.60513.

Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор)

Д. А. Козин^{1,2*}, З. С. Шпрах^{1,2}, В. Ю. Решетняк², О. В. Нестерова², И. Н. Аверцева², Г. М. Родионова²

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

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

*Контактное лицо: Козин Дмитрий Андреевич. E-mail: kozin1993@inbox.ru

ORCID: Д. А. Козин – <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>; З. С. Шпрах – <https://orcid.org/0003-3034-750X>; В. Ю. Решетняк – <https://orcid.org/0000-0003-1704-7828>;

О. В. Нестерова – <https://orcid.org/0000-0002-7424-0627>; И. Н. Аверцева – <https://orcid.org/0000-0003-2500-0384>; Г. М. Родионова – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>.

Статья поступила: 18.09.2020. Статья принята в печать: 23.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В настоящее время на территории Российской Федерации злокачественными опухолями заболевают более 600 тысяч человек в год. Несмотря на большой выбор противоопухолевых препаратов и разнообразие механизмов их действия, эффективность существующих препаратов продолжает оставаться недостаточной. Основными недостатками большинства противоопухолевых препаратов являются возникновение толерантности к ним опухолевых клеток, ограниченный спектр действия и высокая токсичность. В связи с этим создание эффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов по-прежнему сохраняет свою актуальность. Среди многочисленных природных и синтетических гетероциклических соединений, проявляющих противоопухолевую активность все больший интерес вызывают производные индоло[2,3-а]карбазола, способные к инициации различных путей гибели опухолевых клеток. Основными мишенями для их действия являются топоизомеразы и протеинкиназы, играющие важную роль в процессах репликации, транскрипции, репарации или рекомбинации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Помимо противоопухолевой активности данная группа соединений проявляет антибактериальную, антипротозойную и иммуномодулирующую активность, что делает их весьма перспективным классом кандидатов на создание новых лекарственных препаратов.

Текст. Целью данного обзора является обсуждение инструментальных методов качественного и количественного анализа производных индоло[2,3-а]карбазола, применяемых в ведущих фармакопиях мира. Данные методы могут быть использованы как при фармакокинетических исследованиях, так и при стандартизации этих соединений, в виде фармацевтических субстанций или в составе лекарственных форм.

Заключение. Для дальнейшего внедрения новой группы противоопухолевых лекарственных средств на основе производных индоло[2,3-а]карбазола в медицинскую практику необходимо глубокое и тщательное исследование их физико-химических свойств. Обоснование и разработка методик анализа позволяют разработать методы, применимые для фармакокинетического анализа, так и нормативные документы по контролю качества и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола как фармацевтических субстанций. Изучение специальной литературы, в которой описаны методы анализа производных индоло[2,3-а]карбазола, свидетельствует о том, что для определения подлинности и количественного анализа данных соединений наиболее часто используются спектрометрические (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрометрия) и хроматографические (тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография) методы.

Ключевые слова: индоло[2,3-а]карбазол, фармакокинетика, анализ, стандартизация, фармацевтические субстанции, спектрофотометрия, хроматография.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Козин Д. А., Шпрах З. С., Решетняк В. Ю., Нестерова О. В., Аверцева И. Н., Родионова Г. М. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135>

Indolo[2,3-a]carbazole Derivatives with Antitumor Activity and Instrumental Methods for Their Investigation (Review)

Dmytry A. Kozin^{1,2}, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Vladimir Yu. Reshetnyak², Olga V. Nesterova², Irina N. Avertseva², Galina M. Rodionova²

1 – Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia

2 – 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: Dmytry A. Kozin. E-mail: kozin1993@inbox.ru

ORCID: Dmytry A. Kozin – <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>; Zoya S. Shprakh – <https://orcid.org/0003-3034-750X>; Vladimir Yu. Reshetnyak – <https://orcid.org/0000-0003-1704-7828>;

Olga V. Nesterova – <https://orcid.org/0000-0002-7424-0627>; Irina N. Avertseva – <https://orcid.org/0000-0003-2500-0384>; Galina M. Rodionova – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>.

Received: 18.09.2020. Revised: 23.10.2020. Published: 24.11.2020

© Козин Д. А., Шпрах З. С., Решетняк В. Ю., Нестерова О. В., Аверцева И. Н., Родионова Г. М., 2020

© Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Avertseva I. N., Rodionova G. M., 2020

Abstract

Introduction. Currently, more than 600 thousand people a year are affected by malignant tumors on the territory of the Russian Federation. Despite the large selection of antitumor drugs and the variety of mechanisms of their action, the effectiveness of existing drugs continues to be insufficient. The main disadvantages of most antitumor drugs are the emergence of tolerance to them of tumor cells, a limited range of action and high toxicity. In this regard, the creation of effective original domestic antitumor drugs still remains relevant. Among the numerous natural and synthetic heterocyclic compounds that exhibit antitumor activity, indolo[2,3-a]carbazole derivatives that can initiate various pathways of tumor cell death are of increasing interest. The main targets for their action are topoisomerases and protein kinases, which play an important role in the processes of replication, transcription, repair or recombination of deoxyribonucleic acid (DNA). Due to this, in addition to antitumor activity, this group of compounds shows antibacterial, antiprotozoal and immunomodulatory activity, which makes them a very promising class of candidates for the creation of new drugs.

Text. The purpose of this review is to discuss instrumental methods for qualitative and quantitative analysis of indolo[2,3-a]carbazole derivatives used in the world's leading pharmacopoeias. These methods can be used both in pharmacokinetic studies, and in the standardization of these compounds, in the form of pharmaceutical substances, or as part of drug forms.

Conclusion. To further introduce a new group of antitumor drugs based on indole[2,3-a]carbazole derivatives into medical practice, a deep and thorough study of their physical and chemical properties is necessary. Justification and development of analysis methods allow us to develop methods applicable to pharmacokinetic studies, as well as to create regulatory documents for quality control and standardization of indolo[2,3-a]carbazole derivatives as pharmaceutical substances. A study of the literature that describes methods for analyzing indolo[2,3-a]carbazole derivatives indicates that spectrometric (infrared and ultraviolet spectrometry) and chromatographic (thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography) methods are most often used to determine the authenticity and quantitative analysis of these compounds.

Keywords: indolo[2,3-a] carbazole, pharmacokinetics, analysis, standardization, pharmaceutical substances, spectrophotometry, chromatography.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Kozin D. A., Shprakh Z. S., Reshetnyak V. Yu., Nesterova O. V., Avertseva I. N., Rodionova G. M. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135>

ВВЕДЕНИЕ

В связи с ростом числа заболеваний злокачественными опухолями среди населения Российской Федерации разработка новых противоопухолевых препаратов остается одной из важных задач развития здравоохранения.

Среди многочисленных гетероциклических соединений, проявляющих противоопухолевую активность, все больший интерес вызывают производные индола[2,3-а]карбазола.

Первый представитель индола[2,3-а]карбазолов с противоопухолевой активностью – *стауроспорин*, (рисунок 1) – был выделен из культуры *Streptomyces staurosporeus* еще в 1977 году. В том же году установлено его строение [1].

Позднее из *Nocardia aerocolonigenes* был выделен второй противоопухолевый антибиотик из этой группы – *ребеккамицин* (рисунок 2), отличающийся от стауроспорина наличием в структуре атомов хлора, связанных с 1 и 11 атомами углерода, имидной связью в положении 6 и N-гликозидной связью с атомом азота в положении 12 [2].

В последующем из различных микроорганизмов был выделен ряд производных стауроспорина и ребеккамицина, также проявивших противоопухолевую активность [3, 4].

Основными мишенями для действия производных индола[2,3-а]карбазола являются *топоизомеразы* и *протеинкиназы*, играющие важную роль в процессах репликации, транскрипции, репарации или рекомби-

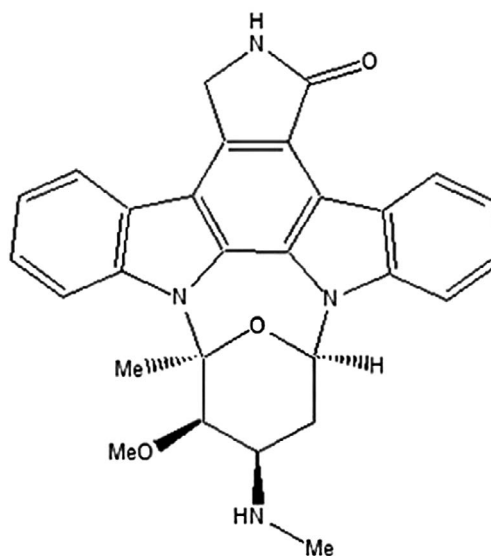


Рисунок 1. Стауроспорин

Figure 1. Staurosporin

нации ДНК, что делает их весьма перспективным классом новых противоопухолевых препаратов [5–10].

Большим препятствием для разработки лекарственных форм производных индолакарбазола, активных в доклинических исследованиях *in vitro*, является их ограниченная растворимость, например ребеккамицин имеет растворимость в воде менее 10^{-5} г/мл [11].

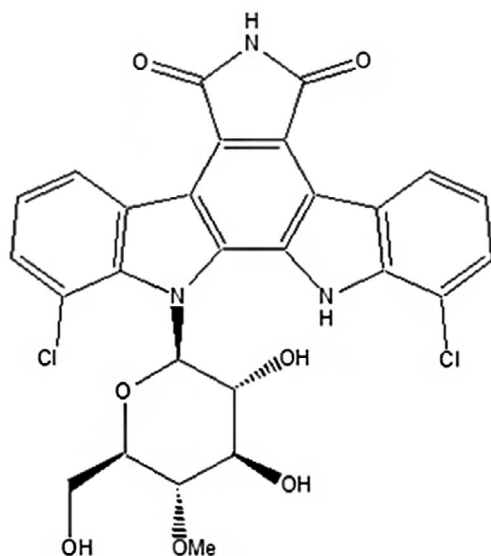


Рисунок 2. Ребеккамицин

Figure 2. Rebeccamycin

Поэтому продолжается активный поиск производных индола[2,3-а]карбазола, обладающих большей биологической активностью и большей гидрофильностью, который проводится как путем модификации структуры соединений методами химического синтеза, так и путем создания лекарственных форм на основе уже имеющихся соединений с применением солюбилизаторов или липосомальных лекарственных форм [12–14].

Целью данного обзора является обсуждение инструментальных методов качественного и количественного анализа, которые могут быть использованы как для фармакокинетических исследований, так и для контроля качества и стандартизации как фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов на их основе.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Анализ производных индола[2,3-а]карбазола методом инфракрасной спектроскопии

Инфракрасная (ИК-) спектроскопия широко используется при качественной характеристике выделенных из природных источников или синтетических производных индола[2,3-а]карбазола. Например, качественный анализ многочисленных аналогов ребеккамицина методом ИК-спектроскопии в дисках бромида калия показал, что они имеют характерные полосы поглощения в диапазоне от 3450 до 740 см^{-1} . Так, соединение AT2433-A1, выделенное из *Actinomadura melliaura* (рисунок 3), имеет полосы поглощения с пиками при 3425 и 3362 см^{-1} . Данные пики свидетельствуют о большом количестве гидроксильных групп в углеводном фрагменте AT2433-A1, а пики при 768 и 759 см^{-1} указывают на наличие органически связанного хлора в ароматическом кольце [15].

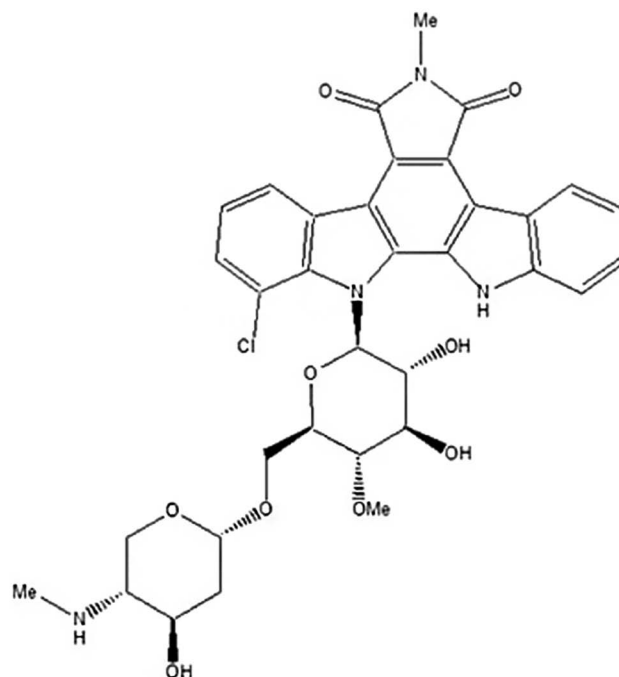


Рисунок 3. AT2433-A1

Figure 3. AT2433-A1

Другое производное стауроспорина (рисунок 4), полученное из культуры *Streptomyces longisporoflavus*, характеризуется пиками при 1680 и 1590 см^{-1} , указывающими на амидную группу, и пиком при 740 см^{-1} , свидетельствующим об ароматической природе соединения [16].

ИК-спектры ряда фторсодержащих производных ребеккамицина (рисунки 5 а-с) имеют полосы, характерные для фтороорганических соединений в диапазоне от 1384–1054 см^{-1} . Примерами таких соединений являются фториндолакарбазолы В и С (рисунки 6 б, с) с пиками при 1745 см^{-1} и 1752 см^{-1} соответственно, которые указывают на наличие малемидной группы в их структуре. Пики при 764 см^{-1} и 762 см^{-1} соответственно, подтверждают ароматическую природу данных соединений [17].

Ряд отечественных синтетических производных индола[2,3-а]карбазола, проявивших противоопухолевую активность, с общей формулой, изображенной на рисунке 6 и лабораторным шифром ЛХС, имеют в ИК-спектре характерные для малемидной группы полосы при 1750, 1730 и 1745 см^{-1} [18].

Анализ производных индола[2,3-а]карбазола методом ультрафиолетовой спектрофотометрии

Наличие в структуре всех производных индола[2,3-а]карбазола большого количества сопряженных π -связей позволяет успешно применять метод ультрафиолетовой (УФ-) спектрофотометрии как для идентификации этих соединений, так и для их ко-

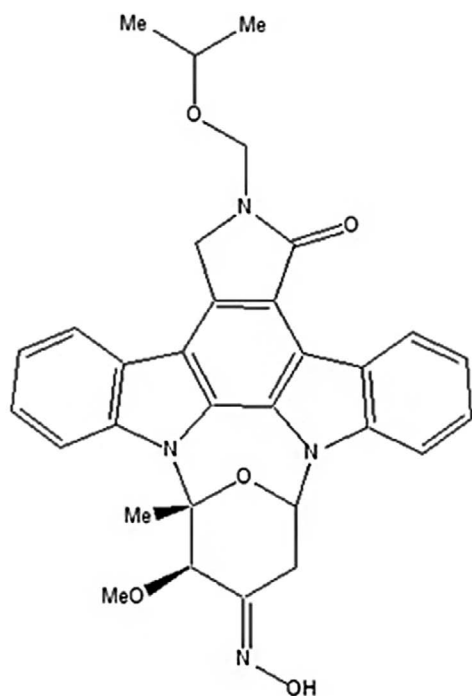


Рисунок 4. Производное стауроспорина, выделенное из культуры *Streptomyces longisporoflavus*

Figure 4. Staurosporin derivative isolated from *Streptomyces longisporoflavus*

личественного анализа в лекарственных средствах. Большинство из указанных ниже производных имеют характерные максимумы поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Так, например, УФ-спектр

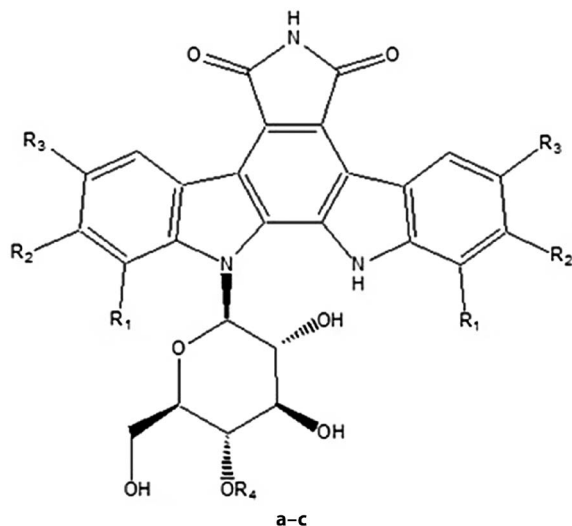


Рисунок 5. Фториндокарбазолы А, В и С

а – Фториндокарбазол А: (R1-H, R2-F, R3=H, R4-Me); **б** – Фториндокарбазол В: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-H); **с** – Фториндокарбазол С: (R1-H, R2-H, R3-F, R4-H)

Figure 5. Fluorindolocarbazoles A, B and C

а – Fluorindolocarbazole A: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-Me); **б** – Fluorindolocarbazole B: (R1-H, R2-F, R3-H, R4-H); **с** – Fluorindolocarbazole C: (R1-H, R2-H, R3-F, R4-H)

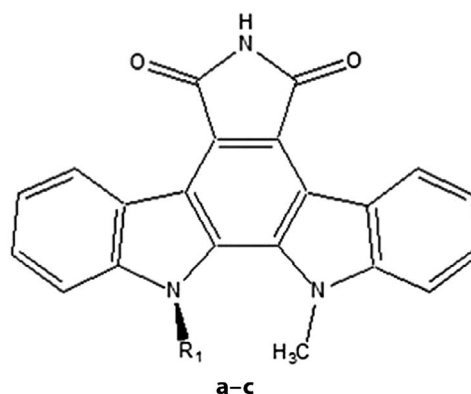


Рисунок 6. Производные индоло[2,3-а]карбазола – предшественники серии препаратов ЛХС

а – (R-рибоза); **б** – (R-галактоза); **с** – (R-лактоза)

Figure 6. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives are precursors of the “LHS” drug series

а – (R-ribose); **б** – (R-galactose); **с** – (R-lactose)

раствора фториндокарбазола А в метаноле (рисунок 6 а) имеет максимумы поглощения при 228, 256, 280, 316 и 398 нм с максимальной экстинкцией около 1050 при волне 316 ± 2 нм [17].

Отечественное производное индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1208 имеет максимумы поглощения при 287, 320 и 420 нм в диметилформамиде. Максимальная экстинкция наблюдается при длине волны 320 ± 2 нм и составляет 1054 ± 30 (рисунок 7) [19].

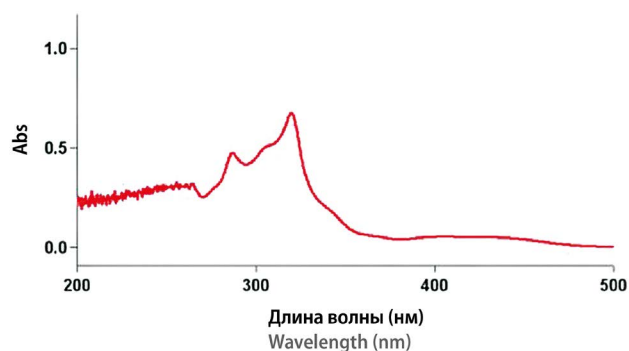


Рисунок 7. Электронный спектр поглощения ЛХС-1208 (0,0006 % раствор в диметилформамиде)

Figure 7. Electronic absorption spectrum of LHS-1208 (0.0006 % solution in dimethylformamide)

Описанное выше соединение с лабораторным шифром AT2433-A1, демонстрирует максимумы поглощения при 283, 316 и 395 нм с максимальной экстинкцией 45562 при 316 нм [15].

Хроматографические методы анализа

Наиболее распространенными фармакопейными методами хроматографического анализа, которые применяются при идентификации вновь полученных

соединений, являются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола методом ВЭЖХ

Многочисленные работы по синтезу, выделению из природных источников производных индоло[2,3-а]карбазола включают методы ВЭЖХ с использованием разнообразных стационарных фаз, систем элюентов и детекторов. Большинство из описанных методик успешно применяются в фармакокинетических исследованиях при изучении содержания производных индоло[2,3-а]карбазола в биологических жидкостях в неизмененном виде. При дальнейшем усовершенствовании этих методик для фармацевтического анализа может быть возможно их применение для стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола как лекарственных средств. В качестве примера применения ВЭЖХ в фармакокинетике можно рассмотреть определение содержания мидостаурина (рисунок 8), продуцируемого бактериями *Streptomyces staurosporeus*, в плазме крови мышей. Определение мидостаурина проводили с использованием флуориметрического детектора при длинах волн 286/386 нм с разделением анализируемого образца на колонке μ Bondapak RP-18 размером $300 \times 3,9$ мм и размером частиц 10 мкм. В этом случае в качестве подвижной фазы (ПФ) применяли смесь ацетонитрила и 0,001 М раствора ацетата аммония в воде в соотношении 45:55. Предел обнаружения мидостаурина в таких условиях составил 0,5 нг/мл. Применение колонки RP LiChrospher C-18 размером $125 \times 4,0$ мм с диаметром частиц сорбента 5 мкм с использованием ПФ, включающей ацетонитрил (фаза А) и раствор трифторуксусной кислоты в фосфатном буфере (445 мкл/л) (фаза В), позволяет повысить чувствительность методики и обнаруживать минимально 0,1 нг/мл мидостаурина [20].

Другое производное стауроспорина, получившее лабораторный шифр UCN-01, обнаруживали в плазме крови и слюне с использованием диодно-матричного детектора (длина волны 295 нм), колонки Nova-Pak Phenyl размером $150 \times 3,9$ мм (размер частиц 4 мкм) и ПФ, состоящей из 0,05 М раствора аммония ацетата в воде (фаза А) и ацетонитрила (фаза В). Предел обнаружения составил 200 нг/мл [21]. Применение флуориметрического детектора в диапазоне длин волн 310/410 нм и ПФ (0,5 М раствор аммония ацетата в ацетонитриле и 0,2 % водный раствор триэтиламина в соотношении 45:55) позволило снизить предел обнаружения UCN-01 в плазме до 100 нг/мл [22].

Метод ВЭЖХ также применяли при идентификации ребеккамицина и его производных с общей формулой, изображенной на рисунке 9 а–д. В таблице 1 указаны хроматографические условия, применяемые при анализе синтезированных соединений, и времена их удерживания.

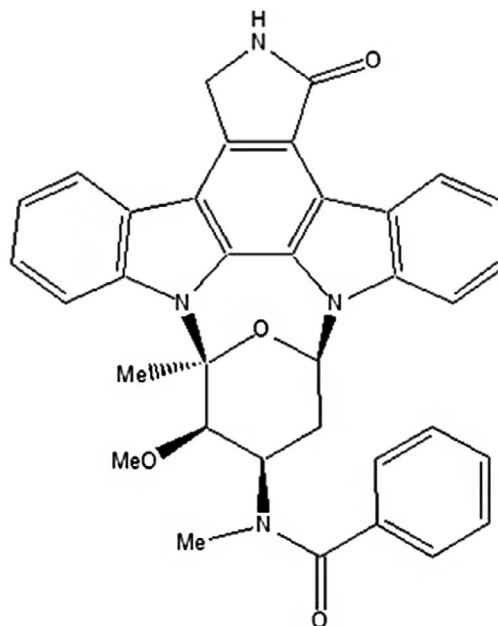


Рисунок 8. Мидостаурин

Figure 8. Midostaurin

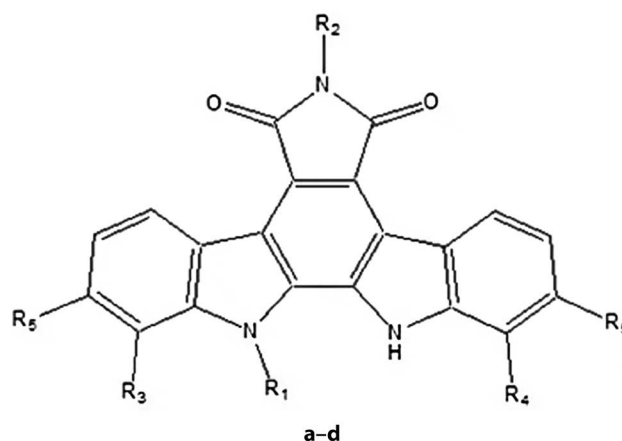


Рисунок 9. Структурная форма ребеккамицина и ряда других производных индоло[2,3-а]карбазола, анализируемых методом ВЭЖХ

a – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=Cl; R4=H; R5=H); b – (R1=Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=H); c – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=F); d – (R1=D-Xyl; R2=NH-C(O)- α -Pyridine; R3=H; R4=H; R5=H)

Figure 9. The structural form of rebekamycin and a number of other indolo[2,3-a]carbazole derivatives analyzed by HPLC

a – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=Cl; R4=H; R5=H); b – (R1=Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=H); c – (R1=4-Me-D-Glc; R2=H; R3=H; R4=H; R5=F); d – (R1=D-Xyl; R2=NH-C(O)- α -Pyridine; R3=H; R4=H; R5=H)

Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола методом ТСХ

За счет высокой селективности и низкой стоимости метод ТСХ успешно применяется как при очистке (препаративная ТСХ), так и при идентификации новых химических соединений.

Таблица 1. Условия и результаты ВЭЖХ некоторых антибиотиков группы ребеккамицина и ряда других производных индоло[2,3-а]карбазола

Table 1. Conditions and results of HPLC of some antibiotics of the rebecamycin group and a number of other indolo[2,3-a]carbazole derivatives

Соединение Compound	Хроматографические условия (колонка, состав ПФ; длина волны) Chromatographic conditions (column, IP composition; wavelength)	Время удерживания, мин R _t , min	Литература References
11 a	Altex Spherisorb ODS 4,6 × 250 мм, 10 мкм Ацетонитрил/метанол/0,1 М водный раствор ацетата аммония 4:3:3; 243 нм Altex Spherisorb ODS 4.6 × 250 mm, 10 μm Acetonitrile/ methanol/0.1 M aqueous solution of ammonium acetate 4:3:3; 243 nm		[23]
11 b	QBX C18 0,1 М водный раствор ацетата аммония/метанол/ацетонитрил 4:3:3; 315 нм 1 M aqueous solution of ammonium acetate/ methanol/acetonitrile 4:3:3; 315 nm		[24]
11 c	μBondapak Waters Associates 3,9 × 300 мм 0,1 М водный раствор ацетата аммония/метанол/ацетонитрил 4:3:3; 313 нм μBondapak Waters Associates 3.9 × 300 mm 0.1 M aqueous solution of ammonium acetate/ methanol/acetonitrile 4:3:3; 313 nm	11,7	[17]
11 d	Zorbax SB-C18 150 × 3 мм, 3,5 μм Градиентный режим фаза А: ацетонитрил/0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде (1:9); фаза В: ацетонитрил/0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде (9,5:0,5) Zorbax SB-C18 150 × 3 mm, 3.5 μm Gradient mode phase A: acetonitrile/0.1 % trifluoroacetic acid solution in water (1:9); phase B: acetonitrile/0.1 % trifluoroacetic acid solution in water (9.5:0.5)	11	[25]

Например, 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин (рисунок 10) и 5'-гидроксистауроспорин, выделенные из культуры *Micromonospora* sp., подвергались качественной оценке на пластинках с силикагелем фирмы «Merck» с диаметром частиц 40–63 мкм с применением аналогичной системы растворителей. Детектирование проводили при длине волны 254 нм или при опрыскивании «ванилиновым реактивом». Значение R_f для 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорина и 5'-гидроксистауроспорина составляло 0,55 и 0,40 соответственно. Помимо указанной выше системы растворителей, авторы применяли систему хлороформ/изопропанол (10:1), в которой R_f составляло 0,35 и 0,25 соответственно [26].

При хроматографировании на силикагеле в системе хлористый метилен/изопропанол (10:1) с последующим детектированием в ультрафиолете при длинах волн 254 нм и 366 нм, 3'-деметокси-3'-гидроксистауроспорин и стауроспорин имели значения R_f 0,14 и 0,69 соответственно [27].

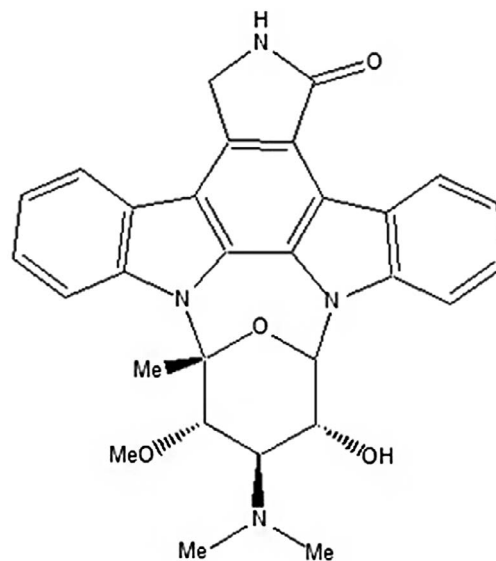


Рисунок 10. 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин

Figure 10. 4' – N-methyl-5'-hydroxystaurosporin

Для оценки качества указанного выше отечественного препарата ЛХС-1208 исследуемый образец анализировали на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А. Идентификацию проводили, просматривая пластинки в УФ-свете. ПФ, применяемые для оценки качества ЛХС-1208, указаны в таблице 2 [13, 28].

Таблица 2. Значения R_f для ЛХС-1208 в различных системах растворителей

Система растворителей Solvent system	R _f ЛХС-1208 R _f LHS-1208
Ацетон : этилацетат : вода (10:4:1) Acetone : ethyl acetate : water (10:4:1)	0,53
Бензол : этанол 95 % (1:1) Benzene : 95 % ethanol (1:1)	0,66
н-бутанол : н-гексан (1:1) n-butanol : n-hexane (1:1)	0,33
Пропанол-2 : 25 % аммиак:ацетон (2:1:3) Propanol-2 : 25 % ammonia:acetone (2:1:3)	0,58
Хлороформ : метанол (5:1) Chloroform : methanol (5:1)	0,77

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых отечественных противоопухолевых препаратов является одной из наиболее актуальных задач, стоящей перед современной наукой. Особый интерес представляют производные индоло[2,3-а]карбазола. Основной отличительной особенностью механизма действия данных соединений является возможность взаимодействовать с несколькими мишенями гибели опухолевых клеток.

Для внедрения этой группы противоопухолевых лекарственных средств в медицинскую практику необходимо глубокое исследование их физико-химических свойств, а также обоснование и разработка

методик анализа как для фармакокинетических исследований, так и для дальнейшей их стандартизации как лекарственных средств.

Литературные данные по методам анализа производных индоло[2,3-а]карбазола свидетельствуют о том, что для определения подлинности противоопухолевых препаратов производных индоло[2,3-а]карбазола наиболее часто используются методы ИК- и УФ-спектрометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

Для фармакокинетических исследований и обнаружения производных индоло[2,3-а]карбазола в биологических жидкостях широкое распространение получил метод ВЭЖХ.

Для количественного анализа и определения чистоты производных индоло[2,3-а]карбазола применяют УФ-спектрофотометрию и ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

- Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*. 1977;30(4):75–282. DOI: 10.7164/antibiotics.30.275.
- Nettleton D. E., Doyle T. W., Krishnan B. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes*. *Tetrahedron. Letters*. 1985;26(34):4011–4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
- Pearce C. J., Doyle T. W., Forenza S., Lam K. S., Schroeder D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. *Journal of Natural Products*. 1988;51(5):937–940. DOI: 10.1021/np50059a020.
- Civjan N. Natural products in chemical biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2012. 31 p. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Natural+Products+in+Chemical+Biology-p-9781118391822>. Accessed: 17.09.2020.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Мельник С. Я. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2006;5(3):123–127.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Миникер Т. Д., Эктова Л. В., Плихтяк И. Л., Горюнова О. В., Мельник С. Я. Изучение противоопухолевой активности N-гликозидов замещенных индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский биотерапевтический журнал*. 2004;3(2):34–35.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Мельник С. Я. Изучение связи структуры и противоопухолевой активности в ряду N-гликозидов, производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2006;5(1):20.
- Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М., Киселева М. П., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Мельник С. Я. Корреляция цитотоксической и противоопухолевой активности в отношении лейкозов в ряду N-гликозилированных производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал*. 2007;6(1):50–51.
- Вартанян А. А., Барышникова М. А., Бузова О. С., Эктова Л. В., Смирнова Л. И., Шпрах З. С. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-алкилирующим агентам. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2016;27(2):165–171.
- Ektova L. V., Goryunova O. V., Eremina V. A., Tikhonova N. I., Medvedeva L. A. An Improved Method for the Synthesis of the of Indole[2,3-a] Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,6-Dione N-Glycosides and their Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):604–609. DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4.
- Kaneko T., Wong H., Utzig J., Schurig J., Doyle T. W. Water soluble derivatives of rebeccamycin. *The Journal of Antibiotics*. 1990;43(1):125–127. DOI: 10.7164/antibiotics.43.125.
- Киселева М. П., Смирнова З. С., Борисова Л. М., Кубасова И. Ю., Эктова Л. В., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Медведева Л. А., Еремина В. А. Тихонова Н. И. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский онкологический журнал*. 2015;20(1):33–37.
- Гулякин И. Д., Хашем А., Николаева Л. Л., Дмитриева М. В., Афанасьева Д. А., Барышникова М. А., Оборотова Н. А., Ланцова А. В. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(2):55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
- Гулякин И. Д., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Дмитриева М. В., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Лаврухин Н. И., Бунятян Н. Д. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;2(15):52–59.
- Matson J. A., Claridge C., Bush J. A., Titus J., Bradner W. T., Doyle T. W., Horan A. C., Patel M. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomyces melleus*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 1989;42(11):547–555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547.
- Cai Y., Fredenhagen A., Hug P., Meyer T., Peter H. H. Further. Further Minor Metabolites of Staurosporine Produced by a *Streptomyces longisporoflavus* Strain. *The Journal of Antibiotics*. 1996;49(6):519–526. DOI: 10.7164/antibiotics.49.519.
- Lam K. S., Schroeder D. R., Veitch J. M., Colson K. L., Matson J. A., Rose W. C., Doyle T. W., Forenza S. Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiotics*. 2001;54(1):1–9. DOI: 10.7164/antibiotics.54.1.
- Бахмедова А. А., Гараева Л. Д., Горюнова О. В., Миникер Т. Д., Плихтяк И. Л., Эктова Л. В., Аданин В. М., Иванова Т. П., Ярцева И. В., Мельник С. Я. N-гликозиды производных индоло[2,3-а]карбазола. *Биоорганическая химия*. 1997;23(8):667–674.
- Ярцева И. В., Игнатьева Е. В., Дмитричева Н. А., Миникер Т. Д., Машалова Н. А., Эктова Л. В., Будько А. П., Шпрах З. С. Стандартизация ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):126–127.
- Van Gijn R., Havik E., Boven E., Vermorken J. B., ten Bokkel Huinink W. W., van Tellingen O., Beijnen J. H. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995;14(1-2):165–174. DOI: 10.1016/0731-7085(95)01616-3.
- Bauer K. S., Lush R. M., Rudek M. A., Shih C., Sausville E., Figg W. D. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva. *Biomedical Chromatography*. 2000;14(5):338–343. DOI: 10.1002/1099-0801(200008)14:5<338::AID-BMC993>3.0.CO;2-6.
- Smith J. A., Cortes J., Newman R. A., Madden T. L. Development of a simplified, sensitive high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection to determine the concentration of UCN-01 in human plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Science and Applications*. 2001;760(2):247–253. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00276-629.
- Matson J. A., Bristol Myers Co. [US], Process for preparing 4'-deschlororebeccamycin. United States Patent № 4,567,143. Jan. 28, 1986.
- Forenza S., Lan Kin S., Matson J. A., Mattei J., McDonald L., inventors. Bristol Myers Squibb Co. [US], assigne. Antitumor antibiotic BMY-41219. United States Patent № 5,326,754. Jul. 5, 1994.
- Козин Д. А. Определение содержания действующего вещества в субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сборник тезисов XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2020. 124 р. Доступно по: <http://pirogovka.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/science/sno/pirogovka/2020/BOOK-of-ABSTRACTS-2020corr.pdf>. Ссылка активна на 17.09.2020.
- Hernández L. M., Blanco J. A., Baz J. P., Puentes J. L., Millán F. R., Vázquez F. E., Fernández-Chimeno R. I., Grávalos D. G. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain. *The Journal of Antibiotics*. 2000;53(9):895–902. DOI: 10.7164/antibiotics.53.895.

27. Hoehn P., Ghisalba O., Moerker T., Peter H. H. 3'-demethoxy-3'-hydroxystaurosporine a Novel Staurosporine Analogue Produced by a Blocked Mutant. *The Journal of Antibiotics*. 1995;48(4):300–305. DOI: 10.7164/antibiotics.48.300.
28. Гулякин И. Д., Ланцова А. В., Санарова Е. В., Николаева Л. Л., Оборотова Н. А., Игнат'ева Е. В., Дмитричева Н. А., Ярцева И. В., Шпрах З. С. Применение тонкослойной хроматографии для идентификации ЛХС-1208 в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(1):28–29.

REFERENCES

1. Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya J., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics*. 1977;30(4):75–282. DOI: 10.7164/antibiotics.30.275.
2. Nettleton D. E., Doyle T. W., Krishnan B. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes*. *Tetrahedron. Letters*. 1985;26(34):4011–4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
3. Pearce C. J., Doyle T. W., Forenza S., Lam K. S., Schroeder D. R. The biosynthetic origins of rebeccamycin. *Journal of Natural Products*. 1988;51(5):937–940. DOI: 10.1021/np50059a020.
4. Civjan N. Natural products in chemical biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2012. 31 p. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Natural+Products+in+Chemical+Biology-p-9781118391822>. Accessed: 17.09.2020.
5. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Borisova L. M., Kiseleva M. P., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Ektova L. V., Mel'nik S. Ya. Antitumor activity of N-glycosides of indolo[2,3-a]carbazole derivatives. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2006;5(3):123–127. (In Russ.).
6. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Miniker T. D., Ektova L. V., Plihtjak I. L., Goryunova O. V., Mel'nik S. Ya. Study of antitumor activity of N-glycosides of substituted indolo [2,3-a]carbazoles. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2004;3(2):34–35. (In Russ.).
7. Smirnova Z. S., Kubasova I. Ju., Borisova L. M., Kiseleva M. P., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Ektova L. V., Mel'nik S. J. Study of the relationship between the structure and antitumor activity in a series of N-glycosides derived from indolo[2,3-a]carbazole. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2006;5(1):20. (In Russ.).
8. Correlation of cytotoxic and antitumor activity against leukemias in a series of N-glycosylated derivatives of indolo [2,3-a]carbazole. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2007;6(1):50–51. (In Russ.).
9. Vartanyan A. A., Baryshnikova M. A., Burova O. S., Ektova L. V., Smirnova L. I., Shprakh Z. S. The blocker of vasculogenic mimicry restores the sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-alkylating agents. *Vestnik RONC im. N. N. Blohina = Journal of N. N. Blochin Russian Cancer Research Center*. 2016;27(2):165–171. (In Russ.).
10. Ektova L. V., Goryunova O. V., Eremina V. A., Tikhonova N. I., Medvedeva L. A. An Improved Method for the Synthesis of the of Indole[2,3-a] Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,6-Dione N-Glycosides and their Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):604–609. DOI: 10.1007/s11094-019-02046-4.
11. Kaneko T., Wong H., Utzig J., Schurig J., Doyle T. W. Water soluble derivatives of rebeccamycin. *The Journal of Antibiotics*. 1990;43(1):125–127. DOI: 10.7164/antibiotics.43.125.
12. Kiseleva M. P., Smirnova Z. S., Borisova L. M., Kubasova I. Ju., Ektova L. V., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Medvedeva L. A., Eremina V. A. Tihonova N. I. Search for new antitumor compounds among N-glycosides derivatives of indolo [2,3-a]carbazoles. *Rossiiskij onkologicheskij zhurnal = Russian Journal of Oncology*. 2015;20(1):33–37. (In Russ.).
13. Gulyakin I. D., Hashem A., Nikolaeva L. L., Dmitrieva M. V., Afanas'eva D. A., Baryshnikova M. A., Oborotova N. A., Lantsova A. V. Development of a new technology for obtaining a dosage form for intravenous administration of the indolocarbazole derivative LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2016;15(2):55–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
14. Gulyakin I. D., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Dmitrieva M. V., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Orlova O. L., Polozkova A. P., Lavruhin N. I., Bunjatjan N. D. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;2(15):52–59. (In Russ.).
15. Matson J. A., Claridge C., Bush J. A., Titus J., Bradner W. T., Doyle T. W., Horan A. C., Patel M. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura melliaura*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. 1989;42(11):547–555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547.
16. Cai Y., Fredenhagen A., Hug P., Meyer T., Peter H. H. Further. Further Minor Metabolites of Staurosporine Produced by a *Streptomyces longisporoflavus* Strain. *The Journal of Antibiotics*. 1996;49(6):519–526. DOI: 10.7164/antibiotics.49.519.
17. Lam K. S., Schroeder D. R., Veitch J. M., Colson K. L., Matson J. A., Rose W. C., Doyle T. W., Forenza S. Production, isolation and structure determination of novel fluoroindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocoligenes* ATCC 39243. *The Journal of Antibiotics*. 2001;54(1):1–9. DOI: 10.7164/antibiotics.54.1.
18. Bahmedova A. A., Garaeva L. D., Goryunova O. V., Miniker T. D., Plihtjak I. L., Jektova L. V., Adanin V. M., Ivanova T. P., Yartseva I. V., Mel'nik S. Ja. N-glycosides of indolo[2,3-a]carbazole derivatives. *Biorganicheskaja khimija = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 1997;23(8):667–674. (In Russ.).
19. Yartseva I. V., Ignat'eva E. V., Dmitricheva N. A., Miniker T. D., Mashalova N. A., Ektova L. V., Bud'ko A. P., Shprakh Z. S. Standardization of LHS-1208. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016;15(1):126–127. (In Russ.).
20. Van Gijn R., Havik E., Boven E., Vermorken J. B., ten Bokkel Huinink W. W., van Tellingen O., Beijnen J. H. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995;14(1-2):165–174. DOI: 10.1016/0731-7085(95)01616-3.
21. Bauer K. S., Lush R. M., Rudek M. A., Shih C., Sausville E., Figg W. D. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva. *Biomedical Chromatography*. 2000;14(5):338–343. DOI: 10.1002/1099-0801(200008)14:5<338::AID-BMC993>3.0.CO;2-6.
22. Smith J. A., Cortes J., Newman R. A., Madden T. L. Development of a simplified, sensitive high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection to determine the concentration of UCN-01 in human plasma. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Science and Applications*. 2001;760(2):247–253. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00276-629.
23. Matson J. A., Bristol Myers Co. [US], Process for preparing 4'-deschlororebeccamycin. United States Patent № 4,567,143. Jan. 28, 1986.
24. Forenza S., Lan Kin S., Matson J. A., Mattei J., McDonald L., inventors. Bristol Myers Squibb Co. [US], assigne. Antitumor antibiotic BMY-41219. United States Patent № 5,326,754. Jul. 5, 1994.
25. Kozin D. A. Determination of the active substance content in the substance of the drug LHS-1269 by high-performance liquid chromatography. Collection of abstracts of the XV International (XXIV all-Russian) Pirogov scientific medical conference of students and young scientists. Moscow: Pirogov Federal STATE medical University of The Ministry of health of Russia. 2020. 124 p. Available at: <http://pirogovka.rsmu.ru/fileadmin/rsmu/img/science/sno/pirogovka/2020/BOOK-of-ABSTRACTS-2020corr.pdf>. Accessed: 17.09.2020.
26. Hernández L. M., Blanco J. A., Baz J. P., Puentes J. L., Millán F. R., Vázquez F. E., Fernández-Chimeno R. I., Grávalos D. G. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain. *The Journal of Antibiotics*. 2000;53(9):895–902. DOI: 10.7164/antibiotics.53.895.
27. Hoehn P., Ghisalba O., Moerker T., Peter H. H. 3'-demethoxy-3'-hydroxystaurosporine a Novel Staurosporine Analogue Produced by a Blocked Mutant. *The Journal of Antibiotics*. 1995;48(4):300–305. DOI: 10.7164/antibiotics.48.300.
28. Gulyakin I. D., Lantsova A. V., Sanarova E. V., Nikolaeva L. L., Oborotova N. A., Ignat'eva E. V., Dmitricheva N. A., Yartseva I. V., Shprakh Z. S. Application of thin-layer chromatography for identification of LHS-1208 in medicinal form. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian journal of Biotherapy*. 2016;15(1):28–29. (In Russ.).

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>
УДК 543.632



Обзорная статья/Review article

Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты (обзор)

А. Х. Амандусова^{1*}, К. Р. Савельева¹, А. В. Морозов¹, В. А. Шелехова¹, Л. В. Персанова¹,
С. В. Поляков¹, В. Н. Шестаков¹

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

*Контактное лицо: Амандусова Акжбек Хасановна. E-mail: amandusova.akh@gilsinp.ru

ORCID: А. Х. Амандусова – <https://orcid.org/0000-0001-6309-6853>; К. Р. Савельева – <https://orcid.org/0000-0002-6344-2522>; А. В. Морозов – <https://orcid.org/0000-0002-8987-2651>;
В. А. Шелехова – <https://orcid.org/0000-0001-8597-061X>; Л. В. Персанова – <https://orcid.org/0000-0003-4124-328X>; С. В. Поляков – <https://orcid.org/0000-0003-4234-1156>;
В. Н. Шестаков – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>.

Статья поступила: 20.05.2020. Статья принята в печать: 02.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В обзоре описаны физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, благодаря которым она нашла применение в офтальмологии. Также были рассмотрены способы определения гиалуроновой кислоты с помощью различных аналитических методов.

Текст. Гиалуроновая кислота (ГК) – это высокомолекулярный гликозаминогликан, который состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. Карбоксильные, гидроксильные и ацетоамидные группы придают молекуле этого анионного гетерополисахарида гидрофильные свойства. В зависимости от того, каким способом получают гиалуроновую кислоту, ее молекулярная масса варьируется в широком диапазоне. Разработаны методы количественного определения гиалуроновой кислоты, к которым относятся: метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также ИК-спектроскопический метод.

Заключение. Благодаря своим свойствам гиалуроновая кислота находит широкое применение как активное вещество в составе лекарственных препаратов. На сегодняшний день разработаны методики количественного определения гиалуроновой кислоты, среди которых метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ИК-спектроскопии, рассмотренные в данной статье, представлены также в Японской фармакопее и Европейской фармакопее. Данные методики получили широкое распространение благодаря высокой воспроизводимости, точности и относительной простоте.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, строение ГК, структура ГК, турбидиметрическое титрование, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в сборе и обработке литературных данных, написании статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Амандусова А. Х., Савельева К. Р., Шелехова В. А., Персанова Л. В., Поляков С. В., Шестаков В. Н., Морозов А. В. Физико-химические свойства и методы количественного определения гиалуроновой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>

Physical and Chemical Properties and Quality Control Methods of Hyaluronic Acid (Review)

Akzhvek Kh. Amandusova^{1*}, Kristina R. Saveleva¹, Andrei V. Morozov¹, Vera A. Shelekhova¹,
Lyudmila V. Persanova¹, Sergei V. Polyakov¹, Vladislav N. Shestakov¹

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

*Corresponding author: Akzhvek Kh. Amandusova. E-mail: amandusova.akh@gilsinp.ru

ORCID: Akzhvek Kh. Amandusova – <https://orcid.org/0000-0001-6309-6853>; Kristina R. Saveleva – <https://orcid.org/0000-0002-6344-2522>;
Andrei V. Morozov – <https://orcid.org/0000-0002-8987-2651>; Vera A. Shelekhova – <https://orcid.org/0000-0001-8597-061X>;
Lyudmila V. Persanova – <https://orcid.org/0000-0003-4124-328X>; Sergei V. Polyakov – <https://orcid.org/0000-0003-4234-1156>;
Vladislav N. Shestakov – <https://orcid.org/0000-0002-6507-7530>.

Received: 20.05.2020. Revised: 02.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. This review describes the physicochemical properties that determine the use of hyaluronic acid in ophthalmology. We have studied methods for determining hyaluronic acid using various analytical methods.

Text. Hyaluronic acid is a high molecular weight glycosaminoglycan that consists of repeating disaccharides of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid. Carboxyl, hydroxyl and acetamide groups give hydrophilic properties to the molecule of this anionic heteropolysaccharide. Depending on how the hyaluronic acid is obtained, its molecular weight varies over a wide range. Researchers developed methods for controlling hyaluronic acid, which include the turbidimetric titration method, the method of high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography and IR spectroscopic method.

Conclusion. Due to its properties, hyaluronic acid is widely used as an active ingredient in pharmaceutical preparations. Today, there are a number of methods for the determination of hyaluronic acid, including the method of turbidimetric titration, the method of capillary electrophoresis. High performance liquid chromatography (HPLC) and IR spectroscopy methods are presented in the Japanese Pharmacopoeia and the European Pharmacopoeia. These techniques are widely used due to their high reproducibility, accuracy, and relative simplicity.

© Амандусова А. Х., Савельева К. Р., Шелехова В. А., Персанова Л. В., Поляков С. В., Шестаков В. Н., Морозов А. В., 2020

© Amandusova A. Kh., Saveleva K. R., Shelekhova V. A., Persanova L. V., Polyakov S. V., Shestakov V. N., Morozov A. V., 2020

Keywords: hyaluronic acid, the structure of HA, turbidimetric titration, IR-spectroscopy, HPLC.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors participated in the collection and processing of literature data, writing the article and discussing the results.

For citation: Amandusova A. Kh., Saveleva K. R., Shelekhova V. A., Persanova L. V., Polyakov S. V., Shestakov V. N., Morozov A. V. Physical and chemical properties and quality control methods of hyaluronic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-136-140>

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой природный полимер, молекулярная масса (ММ) которого варьируется в широких пределах. Средняя ММ макромолекул ГК, содержащихся в синовиальной жидкости человека, составляет 3 140 000 [1].

Благодаря реологическим свойствам растворы, содержащие ГК, являются идеальными смазочными материалами. Помимо этого, ГК обладает гидрофильными свойствами и действует как амортизирующая жидкость.

ГК обладает рядом «фармакологических эффектов», благодаря которым применяется в офтальмологических препаратах. В офтальмологии ГК используется в хирургической практике и входит в состав материала контактных линз для более комфортного ношения [2].

В настоящее время ГК получают методом ферментации с использованием бактерий (*Streptococcus equi* и *Streptococcus zooepidemicus*), что приводит к более высокой степени очистки ГК, улучшая тем самым переносимость препаратов – слезозаменителей [3].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Гиалуроновая кислота (рисунок 1) представляет собой высокомолекулярный гликозаминогликан, который состоит из повторяющихся дисахаридов N-ацетилглюкозамина и D-глюкуроновой кислоты. Атомы водорода COOH-групп некоторых элементарных звеньев β-D-глюкуроновой кислоты могут быть замещены на натрий. Полученные полисахариды называются натриевой или калиевой солью гиалуроновой кислоты (гиалуронат натрия или гиалуронат калия) [1].

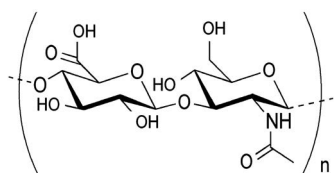


Рисунок 1. Структурная формула гиалуроновой кислоты

Figure 1. Structural formula of hyaluronic acid

В очищенном виде это белый мелкодисперсный порошок. Гиалуроновая кислота – это оптически активный полимер, который растворяется в воде и вод-

ном растворе хлорида натрия, практически нерастворимый в органических растворителях [4, 5].

ГК обладает уникальными реологическими свойствами. Так, в растворе полимерная цепь гиалуронана принимает форму расширенной случайной спирали. Эти цепочки сцепляются друг с другом при очень низких концентрациях. При более высоких концентрациях растворы имеют чрезвычайно высокую, но зависящую от сдвига вязкость. 1 % раствор похож на «желе», но когда он находится под давлением, он легко перемещается и может быть введен через иглу с маленьким отверстием. Поэтому его называют «псевдопластическим» материалом. Эластические свойства раствора изменяются по мере нарастания концентрации и молекулярной массы полимеров [6]. В концентрированных растворах гиалуроновая кислота приобретает различные пространственные структуры.

Первичная структура ГК состоит из повторяющихся дисахаридных звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина с количеством водородных связей до 5, существующих между каждыми двумя соседними дисахаридами. Вторичные структуры формируются в виде двухслойных спиралей в форме ленты путем скручивания каждого дисахаридного блока на 180° по сравнению с теми, которые находятся впереди и позади него в цепи [7]. Третичная структура может образовывать в пространстве как β-слой, так и спиральные конфигурации, которые присущи полимеру в растворе, что объясняется водородными связями между гидроксильными группами вдоль цепи полимера [6].

В таких растворах молекулярные клубки переплетаются между собой и происходит образование областей с пониженным содержанием воды, так как определенные дисахаридные звенья определенной молекулы занимают свободные места. Клубки гиалуроновой кислоты, принимающие форму «сжатой губки», начинают расправляться, когда попадают в водную среду, при этом ГК принимает наиболее энергетически выгодную конформацию [8].

Наличие большого количества гидроксильных групп, приводящее к образованию водородных связей, объясняет способность гиалуроновой кислоты удерживать воду. По некоторым исследованиям ГК может удерживать количество воды в 1000 раз превышающее собственную массу [8]. Связывание воды и возникающее вследствие этого набухание определяет биологическую роль ГК в регулировании прони-

цаемости тканей. Гиалуроновая кислота играет роль основного структурообразующего гликозаминогликана (ГАГ), так как связывает коллагеновые волокна, белки и другие вещества в единую систему, образуя тем самым «буферный объем», который дает ту самую прочность и эластичность для механических тканей [1].

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В работе [9] описан метод определения гиалуроната натрия турбидиметрическим титрованием. Метод основан на определении концентрации вещества в растворе по возрастанию мутности (уменьшение пропускания) при добавлении титранта. В качестве коагулянта для осаждения гиалуроната натрия было использовано катионное поверхностно-активное вещество цетилпиридиний хлорид. Для определения точки эквивалентности был использован фототрод. В проведенном исследовании было показано преимущество использования цетилпиридиний хлорида в качестве титранта с концентрацией 1 мг/мл со значением pH, доведенного до $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ с помощью 1 М гидроксида калия либо фосфорной кислотой при длине волны 520 нм.

В работе было отмечено, что увеличение скорости перемешивания влияло на увеличение процента шума передачи. Это может быть из-за образования пузырьков в титровальном стакане, содержащем раствор образца. Значительная ошибка возникла вблизи точки эквивалентности. Скорость перемешивания оптимизировалась путем титрования с разной скоростью. Наиболее лучшие результаты были получены с постоянной скоростью перемешивания 25 %.

Рассчитано относительное стандартное отклонение содержания гиалуроната натрия в шести образцах растворов, которое для гиалуроната натрия составило 1,08 %.

Промежуточная прецизионность была выполнена путем анализа образцов двумя разными исследователями, использующими разные инструменты. Каждый исследователь подготовил стандартный образец и шесть разных образцов. Относительное стандартное отклонение, полученное из 12 результатов анализа двумя исследователями, составило 1,08 % для гиалуроната натрия.

В работе [10] в качестве биозондера для определения гиалуроновой кислоты (ГК) методом вольтамперометрии с линейной разверткой на ртутном капельном электроде был выбран катионный краситель феносафранин. В результате экспериментов было показано, что при электростатическом взаимодействии феносафранина с гиалуроновой кислотой образуется супрамолекулярный комплекс, что в свою очередь приводит к уменьшению вольтамперометрического тока феносафранина. Именно на этом уменьшении высоты пика тока основан непрямой метод определения гиалуроновой кислоты (ГК).

Использовали разное количество ГК с концентрацией 1 г/л в буферном растворе Бриттона – Робинсона (Б-Р) (pH 4.5), чтобы получить спектры поглощения в УФ- и видимой областях феносафранина и его смесей. Максимум поглощения феносафранина составил 529 нм, в то время как в буферном растворе поглощения не наблюдалось.

Были сняты вольтамперометрические кривые производной второго порядка с линейной разверткой; чувствительность этого метода выше, чем у классической полярографии. Приведены типичные вольтамперограммы системы, в которой взаимодействуют феносафранин и гиалуроновая кислота. Были построены кривые буфера Бриттона – Робинсона (Б-Р).

Кривая для феносафранина в буферном растворе Бриттона – Робинсона (pH 4.5) показала хорошо выраженный вольтамперометрический пик тока восстановления при $-0,42$ В. Он относится к восстановлению пиазиновой группы в молекуле феносафранина. Кривые в растворе феносафранина были сняты с различными добавками гиалуроновой кислоты. После добавления гиалуроновой кислоты пик тока восстановления снижается без изменения своего потенциала; это означает, что феносафранин реагирует с гиалуроновой кислотой, образуя в растворе биосупрамолекулярный комплекс.

Таким образом, концентрация феносафранина в растворе понижается, и высота пика тока восстановления постепенно уменьшается. Уменьшение пика тока пропорционально увеличению концентрации гиалуроновой кислоты, что в дальнейшем используется при ее определении.

В исследовании [11] содержание и молекулярную массу гиалуроновой кислоты определяли капиллярным электрофорезом. При использовании необработанного капилляра с расплавленным кремнеземом (длина 75 микрон) длиной 58 см (эффективная длина 50 см) по истечении 15 мин наблюдали пик гиалуроновой кислоты при 20 кВ в 50 мМ фосфатном буфере (pH 4,0). Калибровочные кривые показали линейную зависимость в концентрации от 0,01 мг/мл до 3,3 мг/мл для всех исследованных образцов ГК. Предел обнаружения ГК при 185 нм составлял 1,0 мкг/мл при отношении сигнал-шум равном 5.

Образцы ГК исследовали в буфере, содержащем пуллулан (ПУ), который использовался в качестве добавки для формирования матрицы. Образцы ГК демонстрировали заметное пиковое уширение при анализе в буферном растворе, содержащем ПУ с заданной молекулярной массой.

Известен анализ гиалуроновой кислоты методом гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии с детектором многоугольного светорассеяния [12].

Система гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии является методом измерения молекулярной массы гиалуроновой кислоты. Истинные молекулярные массы могут быть получены при использовании многолучевого рассеяния света в сочетании с

детектором показателя преломления. Приращение показателя преломления (dn/dc) для оценки данных рассеяния света может быть определено в режиме реального времени, измерено в автономном режиме с использованием специализированной аппаратуры или взято из литературы.

Образцы с высокой молекулярной массой требуют более низких скоростей потока и концентраций при хроматографировании. Условия гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии были оптимизированы для гиалуроновой кислоты с высокой молекулярной массой в отношении загрузки, скорости потока, размера частиц колонки и пористости. При подготовке образца было учтено содержание воды около 12 %.

Из-за отсутствия высокомолекулярных калибровочных стандартов рекомендуется использовать определение рассеяния света. Это позволяет также измерять истинные молекулярные массы.

Увеличение показателя преломления (dn/dc) для гиалуроновой кислоты (0,165 мл/г) использовалось для оценки данных рассеяния света. Была изучена концентрация, измеренная детектором, а также измеренная молекулярная масса в режиме реального времени. Восстановление образца составило почти 100 %, что указывает на то, что весь материал элюируется из колонки.

В работе [13] авторами определено содержание гиалуроната натрия с концентрацией 2,0 мг/мл в фармацевтическом составе с помощью ВЭЖХ-УФ. Использовали подвижную фазу, состоящую из буфера 0,05 М дигидрофосфата калия, pH доведено до 7,0 гидроксидом калия (10 %). Хроматографию осуществляли при 25 °C и объем раствора, вводимый в колонку BioSer SEC S2000 (300 × 7,8 мм), составлял 10 мкл, скорость потока 1,0 мл/мин. Обнаружение проводили с использованием УФ-детектора при длине волны 205 нм. Время удерживания гиалуроната натрия составляло около 4,9 мин при коэффициенте асимметрии 1,93.

pH подвижной фазы может влиять на время удерживания аналита, а также чувствительность обнаружения.

Было установлено, что значение pH 7,0 является оптимальным для определения гиалуроната натрия. Концентрация буфера – еще один фактор, который может изменить образование ионной пары.

Снижение высоты пика было замечено при концентрации дигидрофосфата калия менее 0,05 М. Это может быть связано с высоким содержанием водной среды, которая неблагоприятна для ионного шивания.

Инструментальная точность определялась шестью повторностями, рассчитано относительное стандартное отклонение, которое составило 0,49 %.

В исследовании [14] были получены ИК-спектры гиалуроновой кислоты при относительной влажности в диапазоне от 8 до 96 % с шагом 4 %. Инфракрасные спектры измеряли с использованием инф-

ракрасного спектрометра с преобразованием Фурье-преобразования BioRad FTS60a, который был дополнен поляризатором на основе проволоочной сетки. В качестве фона был использован пустой кристалл ATR (без образца).

Интерпретацию ИК-спектра ГК проводили в области 3750–2750 см^{-1} . Широкая полоса поглощения в основном относится к O–H растяжению $\nu_{13}(\text{OH})$ воды. Полоса состоит из (в основном неразрешенных) поддиапазонов, соединенных с водородными связанными гидроксильными группами (3280 см^{-1}), которая включает в себя первый обертоном изгибающего колебания молекул воды при $\nu_2(\text{OH})$: 1650 см^{-1} . При увеличении влажности поглощение $\nu_{13}(\text{OH})$ возрастает.

Кроме того, при указанном выше диапазоне относительной влажности были получены ИК-спектры поглощения в области 1700–1500 см^{-1} для гиалуроновой кислоты (ГК) и хондроитинсульфата (ХС). Поглощение в этой области спектра постепенно уменьшается при более высокой относительной влажности в результате разбавления полисахарида. Увеличенная область показывает, что положение полосы для режима $\nu_{\text{as}}(\text{COO}-)$ сдвигается с 1611 до 1603 см^{-1} для ГК, а также для ХС при увеличении гидратации. Частоты растяжения снижаются в результате образования водородных связей.

Это указывает на то, что наблюдаемый сдвиг частоты обусловлен ассоциацией молекул воды с карбоксильной группой через водородные связи. Дальнейшие изменения положения полос в этой спектральной области не наблюдались. Существование этой полосы в наблюдаемой спектральной области дает убедительные доказательства того, что оптимальное значение pH находится в диапазоне 4–7, что приводит к депротонированному состоянию ($\text{COO}-$). Этот результат подтверждается отсутствием полосы поглощения в группы C=O при 1750–700 см^{-1} .

В работе [15] описывается разработка быстрого, доступного и надежного метода обнаружения гиалуроновой кислоты в сложных образцах.

Метод включает в себя три основных этапа. На первой стадии проводят разделение гиалуроновой кислоты на интерферирующие гликозаминогликаны, а также моно- и олигосахариды фракцией цетилтриметиламмоний бромида. На втором этапе – последующий синтез гиалуроновой кислоты с помощью гиалуронаталлазы *Streptococcus pneumoniae* до 4,5-ненасыщенных дисахаридов (ΔГК2). На заключительной стадии проводят реакцию ΔГК2 с 3-метил-2-бензотиазолинонгидразоном (МБТН), что приводит к интенсивному синему продукту. Коэффициент экстинкции продукта ΔГК2-МБТН составляет 34735 моль⁻¹ при 654 нм. Теоретическая чувствительность анализа составляет 0,07–0,09 мг/л ГК. Практическая чувствительность составляет 0,3 мг/л; максимальная повторяемость достигалась в диапазоне 3–2000 мг/л ГК ($r^2 = 0,9994$). Время анализа составляло 25–60 мин в зависимости от сложности образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре были изучены физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, благодаря которым она применяется в медицине в целом, а в частности в офтальмологическом направлении.

Проанализировав свойства ГК, можно сказать, что данный полимер обладает рядом положительных качеств, среди которых высокая степень удерживания влаги, уникальные реологические свойства, позволяющие ГК проявлять себя как вязкоупругий гель даже при низких концентрациях.

Несмотря на тот факт, что гиалуроновая кислота имеет разные источники происхождения, ее химическая структура всегда одинакова и различается, как уже было рассмотрено выше, только молекулярной массой.

На сегодняшний день известны различные методики количественного определения гиалуроновой кислоты, рассмотренные в данной статье. Среди них метод турбидиметрического титрования, метод капиллярного электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии и ИК-спектроскопии и др. Данные методики получили большое распространение благодаря высокой воспроизводимости, точности и относительной простоте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сигаева Н. Н., Колесов С. В., Назаров П. В., Вильданова Р. Р. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине. *Вестник Башкирского университета*. 2012;17(3):1220–1241.
2. Uddin Md. S., Mamun A. A., Kabir Md. T., Setu J. R., Zaman S., Begum Y., Amran Md. S. Quality Control Tests for Ophthalmic Pharmaceuticals: Pharmacopoeial Standards and Specifications. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2017;14(2):1–17. DOI: 10.9734/JAMPS/2017/33924.
3. Егоров Е. А. Гиалуроновая кислота: применение в офтальмологии и терапии синдрома «сухого глаза». *РМЖ. Клиническая Офтальмология*. 2013;2:71–73.
4. Tan S. W., Johns M. R., Greenfield P. F. Hyaluronic acid – a versatile biopolymer. *Aust. J. Biotechnol.* 1990;4(1):38–43.
5. Meyer K., Palmer J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629–634.
6. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008;53:397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED.
7. Liao Y.-H., Jones S. A., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*. 2005;12:327–342. DOI: 10.1080/10717540590952555.
8. Хабаров В. К вопросу о концентрации гиалуроновой кислоты в препаратах для биоревитализации. *Эстетическая медицина*. 2015;14(1):3–6.
9. Ruckmani K., Shaikh S. Z., Pavne K., Aamer K., Javed A. A New Simple and Rapid Method for the Determination of Sodium Hyaluronate in Active Pharmaceutical Ingredient and Ophthalmic Formulations by DP5 Photoreactor. *World Journal of Analytical Chemistry*. 2014;2(2):15–22. DOI: 10.12691/wjac-2-2-1.
10. Niu X. L., Sun W., Jiao K. Voltammetric determination of hyaluronic acid based on its interaction with phenosafranine. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2009;45:902–907. DOI: 10.1134/s1023193509080102.
11. Kakehi K., Hayase S., Oda Y., Honda S. High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass. *Journal of Chromatography A*. 1997;768(2):295–305. DOI: 10.1016/s0021-9673(96)01095-3.

12. Gp-sec/malls-анализгиалуроновойкислоты. Available at: <http://www.chromatographyonline.com/gpcsec-malls-analysis-hyaluronic-acid-0>. Accessed: 01.03.2019.
13. Ruckmania K., Shaikh S. Z., Khalilb P., Muneerab M. S., Thusleemb O. A. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2013;3(5):324–329. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.02.001.
14. Arnold K., Servaty R., Schiller J., Binder H. Hydration of polymeric components of cartilage – an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001;28(2):121–127. DOI: 10.1016/s0141-8130(00)00161-6.
15. Pepeliaev S., Hrudikova R., Jilkova J., Pavlik J., Smirnou D., Cerny Z., Franke L. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal*. 2017;94:460–470. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036.

REFERENCES

1. Sigaeva N. N., Kolesov S. V., Nazarov P. V., Vil'danova R. R. Chemical modification of hyaluronic acid and its use in medicine. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2012;17(3):1220–1241. (In Russ.).
2. Uddin Md. S., Mamun A. A., Kabir Md. T., Setu J. R., Zaman S., Begum Y., Amran Md. S. Quality Control Tests for Ophthalmic Pharmaceuticals: Pharmacopoeial Standards and Specifications. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2017;14(2):1–17. DOI: 10.9734/JAMPS/2017/33924.
3. Egorov E.A. Hyaluronic acid: it's usage in ophthalmology and in treatment of dry eye syndrome. *RMZH. Klinicheskaya Oftal'mologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology*. 2013;2:71–73. (In Russ.).
4. Tan S. W., Johns M. R., Greenfield P. F. Hyaluronic acid – a versatile biopolymer. *Aust. J. Biotechnol.* 1990;4(1):38–43.
5. Meyer K., Palmer J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629–634.
6. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008;53:397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED.
7. Liao Y.-H., Jones S. A., Forbes B., Martin G. P., Brown M. B. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*. 2005;12:327–342. DOI: 10.1080/10717540590952555.
8. Habarov V. On the concentration of hyaluronic acid in preparations for biorevitalization. *Esteticheskaya medicina*. 2015;14(1):3–6. (In Russ.).
9. Ruckmani K., Shaikh S. Z., Pavne K., Aamer K., Javed A. A New Simple and Rapid Method for the Determination of Sodium Hyaluronate in Active Pharmaceutical Ingredient and Ophthalmic Formulations by DP5 Photoreactor. *World Journal of Analytical Chemistry*. 2014;2(2):15–22. DOI: 10.12691/wjac-2-2-1.
10. Niu X. L., Sun W., Jiao K. Voltammetric determination of hyaluronic acid based on its interaction with phenosafranine. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2009;45:902–907. DOI: 10.1134/s1023193509080102.
11. Kakehi K., Hayase S., Oda Y., Honda S. High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass. *Journal of Chromatography A*. 1997;768(2):295–305. DOI: 10.1016/s0021-9673(96)01095-3.
12. Gp-sec/malls-анализгиалуроновойкислоты. Available at: <http://www.chromatographyonline.com/gpcsec-malls-analysis-hyaluronic-acid-0>. Accessed: 01.03.2019.
13. Ruckmania K., Shaikh S. Z., Khalilb P., Muneerab M. S., Thusleemb O. A. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2013;3(5):324–329. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.02.001.
14. Arnold K., Servaty R., Schiller J., Binder H. Hydration of polymeric components of cartilage – an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001;28(2):121–127. DOI: 10.1016/s0141-8130(00)00161-6.
15. Pepeliaev S., Hrudikova R., Jilkova J., Pavlik J., Smirnou D., Cerny Z., Franke L. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal*. 2017;94:460–470. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>
УДК 615.074



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ

А. М. Суханова^{1,2*}, И. Б. Перова², К. И. Эллер², Г. М. Родионова¹, С. В. Чернова¹, В. Н. Кузина¹

1 – ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
2 – ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

*Контактное лицо: Суханова Анна Михайловна. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

ORCID: А. М. Суханова – <https://orcid.org/0000-0002-8687-8521>; И. Б. Перова – <https://orcid.org/0000-0001-5975-1376>; К. И. Эллер – <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>; Г. М. Родионова – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>; С. В. Чернова – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>; В. Н. Кузина – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>.

Статья поступила: 30.09.2020. Статья принята в печать: 12.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В последнее время наблюдается тенденция роста числа пациентов с ожирением и лишним весом. На сегодняшний день наиболее эффективным лекарственным средством для лечения ожирения и снижения избыточной массы тела является сибутрамин. Лекарственный препарат является ингибитором обратного захвата серотонина и норадреналина, что приводит к уменьшению чувства голода, следовательно, к похудению.

Цель. Разработать и валидировать методику определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом капиллярного электрофореза (КЭ) с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора.

Материалы и методы. С помощью метода КЭ с ультрафиолетовым диодноматричным детектором проводили количественное определение сибутрамина в лекарственных препаратах. В качестве растворителя и рабочего электролита использовали раствор фосфатного буфера 50 ммоль pH = 7,0; для разделения пиков – кварцевый капилляр 56 см, 50 мкм.

Результаты и обсуждение. Валидацию разработанной методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения.

Заключение. Методика количественного определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом КЭ с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора была разработана и валидирована. Данная методика соответствует всем требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики» и может быть использована для проведения контроля качества лекарственных препаратов, действующим веществом которых является сибутрамин.

Ключевые слова: сибутрамин, КЭ, лекарственные препараты, количественное определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. М. Суханова, И. Б. Перова, К. И. Эллер участвовали в разработке и валидации аналитической методики. Г. М. Родионова, С. В. Чернова, В. Н. Кузина отвечали за статистическую обработку. Все авторы участвовали в обсуждении и формировании результатов.

Для цитирования: Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>

Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis

Anna M. Sukhanova^{1,2*}, Irina B. Perova², Konstantin I. Eller², Galina M. Rodionova¹, Svetlana V. Chernova¹, Vera N. Kuzina¹

1 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
2 – Federal Research Center of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

*Corresponding author: Anna M. Sukhanova. E-mail: annamsukhanova@gmail.com

ORCID: Anna M. Sukhanova – <https://orcid.org/0000-0002-8687-8521>; Irina B. Perova – <https://orcid.org/0000-0001-5975-1376>; Konstantin I. Eller – <https://orcid.org/0000-0003-1046-4442>; Galina M. Rodionova – <https://orcid.org/0000-0002-0536-9590>; Svetlana V. Chernova – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>; Vera N. Kuzina – <https://orcid.org/0000-0002-1023-4949>.

Received: 30.09.2020. Revised: 12.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Recently, there has been a growing trend in the number of obese and overweight patients. To date, sibutramine is the most effective drug for treating obesity and overweight. The drug is an inhibitor of the reuptake of serotonin and norepinephrine, which leads to a decrease in hunger, and therefore, to weight loss.

Aim. To develop and validate a methodology for the determination of sibutramine in drugs by capillary electrophoresis (CE) using an ultraviolet diode array detector.

Materials and methods. Quantitative determination of sibutramine in drugs was carried out using the CE method with an ultraviolet diode array detector. A solution of phosphate buffer 50 mmol pH = 7.0 was used as a solvent and working electrolyte; to separate the peaks – quartz capillary 56 cm, 50 μm.

© Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н., 2020

© Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N., 2020

Results and discussion. The developed method was validated according to the following parameters: specificity, linearity, correctness, precision, limit of detection and limit of quantification.

Conclusion. A method for the quantitative determination of sibutramine in drugs by the CE method using an ultraviolet diode array detector has been developed and validated. This method meets all the requirements of General Pharmacopoeia Monograph 1.1.0012.15 «Validation of the analytical method» and can be used to control the quality of drugs, the active pharmaceutical substance of which is sibutramine.

Keywords: sibutramine, EC, drugs, quantification, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anna M. Sukhanova, Irina B. Perova, Konstantin I. Eller participated in the development and validation of the analytical method. Galina M. Rodionova, Svetlana V. Chernova, Vera N. Kuzina were responsible for statistical processing. All authors participated in the discussion and forming of the results.

For citation: Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N. Development and validation of sibutramine determination in drug products by capillary electrophoresis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145>

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается тенденция роста числа пациентов с ожирением и лишним весом [1]. На сегодняшний день наиболее эффективным лекарственным средством для лечения ожирения и снижения избыточной массы тела является сибутрамин.

Согласно ИЮПАК активная фармацевтическая субстанция сибутрамин гидрохлорид моногидрат – (±)-диметил-1-[1-(4-хлорфенил)циклобутил]-N,N,3-триметилбутил-1-амин (рисунок 1).

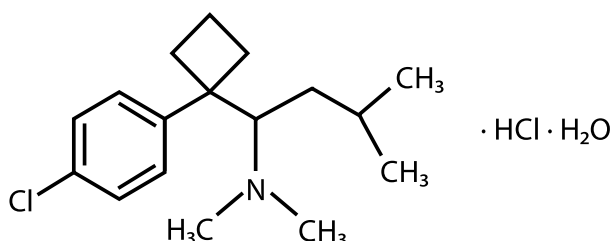


Рисунок 1. Структурная формула сибутрамина

Figure 1. The structural formula of sibutramine

Сибутрамин – ингибитор обратного захвата серотонина и норадреналина, что приводит к уменьшению чувства голода, следовательно, к похудению [2, 3]. Фармакологические эффекты достигаются вследствие образования активных метаболитов под действием изофермента CYP3A4 цитохрома P450 [2, 4, 5].

На основании проведенного анализа литературных источников по определению сибутрамина методом КЭ для определения сибутрамина используются буферные растворы солей с различными значениями pH, в качестве растворителя – рабочий электролит [6–8]. Наиболее оптимальный рабочий электролит подбирался экспериментально – раствор фосфатного буфера со значением pH = 7,0.

На сегодняшний день в РФ данные по определению сибутрамина методом капиллярного электрофореза отсутствуют.

В настоящем исследовании показана разработка и валидация методики определения сибутрамина в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Определение сибутрамина в лекарственных препаратах проводили на системе капиллярного электрофореза Agilent 7100, оснащенной ультрафиолетовым детектором на диодной матрице. Обработка была проведена с помощью программы OpenLAB CDS ChemStation.

Реактивы и растворы

Для проведения исследования были использованы: натрия дигидрофосфат NaH₂PO₄ (х.ч., «Химмед»), вода Milli-Q; 1 М NaOH (Agilent), 0,1 М NaOH (Agilent), метанол (supergradient grade, J.T. Baker). Для приготовления растворов рабочих образцов применяли стандартные образцы: сибутрамина гидрохлорида (Tocris, Великобритания, содержание 100,0 %, годен до 01.2021 г.), целлюлоза микрокристаллическая (Sigma Aldrich, США, содержание 99,9 %, годен до 12.2021 г.), метформина гидрохлорид (USP reference standard).

Исходные и рабочие растворы стандартов растворяли в электролите – растворе фосфатного буфера pH = 7,0.

Пробоподготовка

Приготовление водного раствора фосфатного буфера 50 ммоль pH = 7,0 (NaH₂PO₄; NaOH).

Для приготовления раствора фосфатного буфера 50 ммоль pH = 7 в стакан объемом 1000 мл отмеривают 950 мл воды Milli-Q и, тщательно перемешивая, прибавляют 6000 мг соли натрия дигидрофосфата. Содержимое переносят в мерную колбу вместе

мостью 1000 мл, раствором NaOH 1 М доводят pH до значения 7,0, доводят водой Milli-Q до метки и перемешивают.

Приготовление исходного и рабочего раствора сибутрамина

Навеску сибутрамина около 10 мг (здесь и далее: точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляли 8 мл рабочего электролита, перемешивали до полного растворения, доводили объем до метки раствором фосфатного буфера pH = 7,0 и перемешивали, получая исходный раствор с концентрацией 1,0 мг/мл.

1 мл исходного раствора помещали в колбу на 10 мл, доводили до метки рабочим электролитом, получая раствор стандарта сибутрамина с концентрацией 0,1 мг/мл.

Условия проведения анализа методом КЭ

Условия проведения анализа методом КЭ были подобраны в процессе эксперимента и представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия проведения анализа методом КЭ

Table 1. Analysis conditions for the CE methodology

Параметр Parameter	Значение Value
– рабочий электролит – working electrolyte	Фосфатный буфер 50 ммоль pH = 7,0 Phosphate buffer 50 mmol pH = 7.0
<i>Капилляр Capillary</i>	
Температура Temperature	20 °C
Напряжение Voltage	+20 кВ +20 kV
Сила тока Current strength	100 мА 100 mA
Детектирование Detection	УФ-спектрофотометрическое при $\lambda = 225$ нм UV-spectrophotometric at $\lambda = 225$ nm
<i>Характеристики методики Method characteristics</i>	
Примерное время удерживания, мин (t_R) Approximate retention time, min (t_R)	6 мин 6 min
Время анализа, мин Analysis time, min	8 мин 8 min

Подготовка капилляра к работе

Капилляр между анализами промывают растворами в следующей последовательности:

0,1 М NaOH – 10 минут;

Водой Milli-Q – 10 минут;

Рабочим электролитом – фосфатным буфером pH = 7 – 20 минут.

В случае ежедневного использования системы капиллярного электрофореза в конце анализа капилляр последовательно промывали водой Milli-Q, 0,1 М NaOH, водой Milli-Q и метанолом в течение 5 минут, затем продували воздухом и оставляли концы капилляра на ночь в пустых виалах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики было экспериментально установлено, что подходящим для проведения аналитической методики является кварцевый капилляр длиной 56 см, 50 мкм. При использовании данного капилляра примерное время удерживания составляет 6 минут, общее время анализа – 8 минут.

В процессе эксперимента были протестированы различные растворы электролитов. Наиболее подходящий из них – раствора фосфатного буфера 50 ммоль. Значение pH изменяли от 3,0 до 9,0. При значении pH фосфатного буфера, равного 7,0, примерное время удерживания составляет около 6 минут, достигается получение пика, удовлетворяющего требованиям НД [9].

Валидацию аналитической методики определения сибутрамина методом КЭ проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики», ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV, руководству В. В. Береговых по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения [9, 10].

Для проведения валидации необходимым является приготовление модельных смесей: 0,010 г ($0,010 \pm 0,002$ г ($\pm 20\%$)) субстанции сибутрамина и около 0,156 г плацебо помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, прибавляли 8 мл рабочего электролита, помещали в ультразвуковую ванну на 20 мин. Затем объем содержимого колбы доводили до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм (нейлон). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки электролитом, перемешивали (таблица 2).

Для доказательства специфичности получали хроматограммы: растворителя – рабочего электролита, раствора стандарта сибутрамина, целлюлозы микрокристаллической, метформина, модельной смеси (сибутрамин и МКЦ), модельной смеси (сибутрамин и метформин) (рисунки 2–6).

Растворитель, МКЦ и метформин не мешают определению сибутрамина, чем определяется специфичность методики.

Линейность валидируемой методики была определена на 9 модельных смесях (таблица 2) согласно полученной калибровочной кривой (рисунок 7).

Таблица 2. Приготовление модельных смесей

Table 2. Preparation of model mixtures

№ модельной смеси № of model mixture	Необходимо внести сибутрамина, г Necessary to add sibutramine, g	V колбы, мл V flask, ml	Кратность разведения Dilution ratio
1	0,0080	10	10
2	0,0085	10	10
3	0,0090	10	10
4	0,0095	10	10
5	0,0100	10	10
6	0,0105	10	10
7	0,0110	10	10
8	0,0115	10	10
9	0,0120	10	10

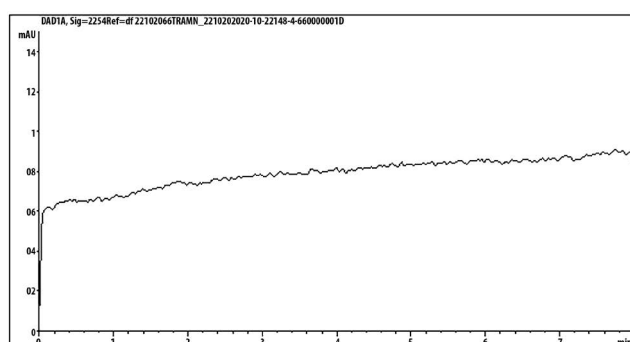


Рисунок 2. Хроматограмма растворителя

Figure 2. Chromatogram of the solvent

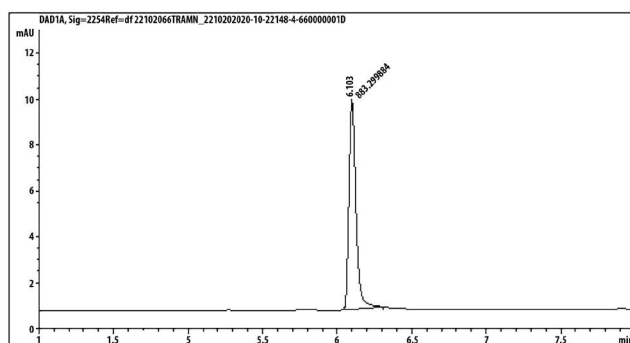


Рисунок 3. Хроматограмма раствора стандарта сибутрамина

Figure 3. Chromatogram of a sibutramine standard solution

Значение коэффициента корреляции R^2 составляет 0,9989 (более 0,9950) при $y = 9886,9x - 13,248$ [x – концентрация (мг/мл), y – площадь пика].

При оценке прецизионности и правильности проводили хроматографирование на 9 уровнях по 3 повторных анализа на каждом из них.

Правильность методики продемонстрирована определением степени извлечения сибутрамина, введенного в модельные смеси.

Из таблицы 3 следует, что извлечение сибутрамина из модельных смесей в условиях эксперимента проходит полностью, относительная ошибка единич-

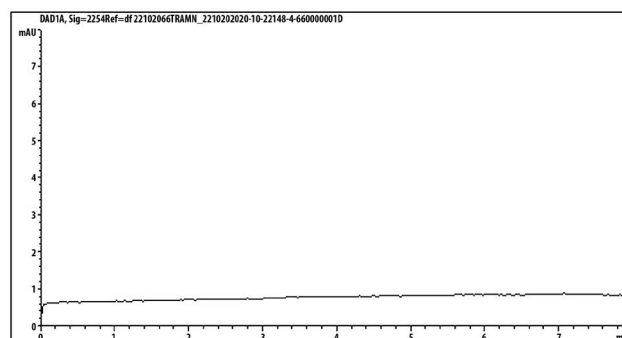


Рисунок 4. Хроматограмма целлюлозы микрокристаллической

Figure 4. Chromatogram of microcrystalline cellulose

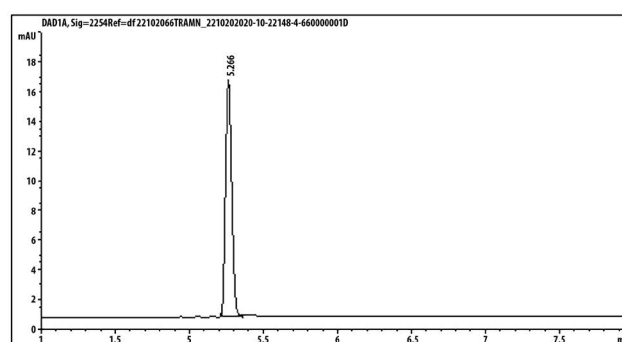


Рисунок 5. Хроматограмма раствора метформина

Figure 5. Chromatogram of metformin solution

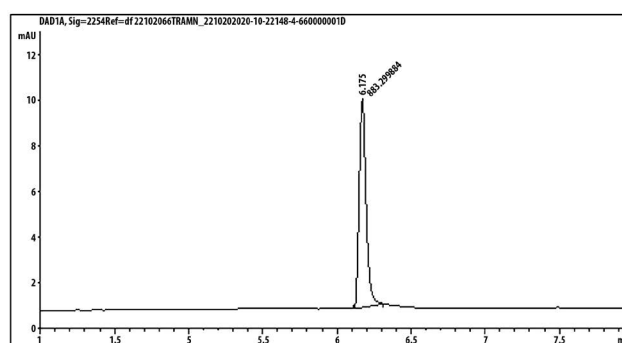


Рисунок 6. Хроматограмма модельной смеси

Figure 6. Chromatogram of model mixture

ного определения не превышает 1,5 % (0,44 %). Доверительный интервал $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ ($99,89 \pm 0,44$ %) включает 100 %, расчетное значение критерия Стьюдента $t_{\text{расч.}}$ (1,73) меньше табличного $t_{\text{табл.}}$ (2,36), следовательно, методика правильна, систематическая ошибка отсутствует.

Для оценки прецизионности (сходимости) результатов был рассчитан коэффициент вариации (RSD), не превышающий 1 % (0,59 %).

Предел обнаружения сибутрамина был установлен на уровне 0,005 мг/мл. Предел количественного определения составил 0,0125 мг/мл.

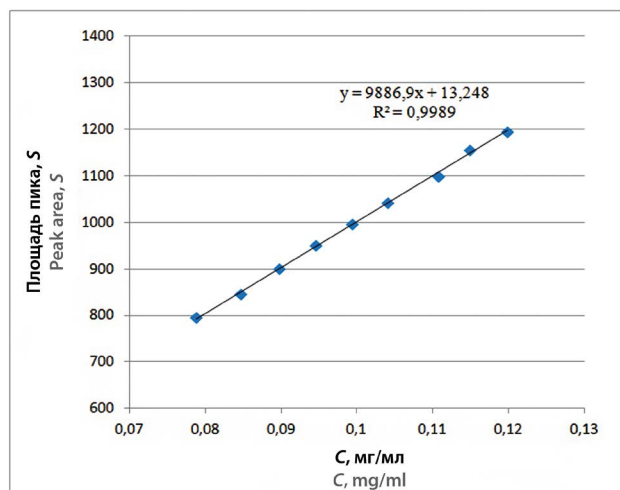


Рисунок 7. Калибровочный график линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора сибутрамина

Picture 7. The calibration curve dependence of the ratio area peak (S) to the concentration (C) of sibutramine solution

Таблица 3. Результаты количественного определения сибутрамина в модельных смесях

Table 3. Results of the quantitative determination of sibutramine in model mixtures

№	Взято, мг/мл (C ₁) Taken, mg/ml (C ₁)	Найдено, мг/мл (C ₂) Found, mg/ml (C ₂)	Абсолютная ошибка, мг/мл (d = C ₂ - C ₁) An absolute mistake, mg/ml (d = C ₂ - C ₁)	Относительная ошибка, % (Y = d × 100/C ₁) Relative error, % (Y = d × 100/C ₁)	Найдено, % Found, %	Метрологические характеристики (P = 95 %, n = 9) Metrological characteristics (P = 95 %, n = 9)
1	0,0791	0,0788	-0,0003	-0,38	99,62	n = 9 $\bar{X} = 99,89$ $S = 0,59$ $S_{\bar{X}} = 0,20$ $\Delta\bar{X} = 0,44$ $\bar{\varepsilon} = 0,44 \%$ $t_{\text{расч.}} = 1,73$ $t_{\text{табл.}} = 1,73$ $t_{\text{расч.}} = 2,36$ $t_{\text{табл.}} = 2,36$ RSD = 0,59 %
2	0,0845	0,0847	0,0002	0,24	100,24	
3	0,0903	0,0898	-0,0005	-0,55	99,45	
4	0,0950	0,0945	-0,0005	-0,53	99,47	
5	0,0997	0,0994	0,0003	0,30	99,70	
6	0,1049	0,1041	0,0008	0,76	99,24	
7	0,1102	0,1107	0,0005	0,45	100,45	
8	0,1151	0,1148	-0,0003	-0,26	99,74	
9	0,1197	0,1198	0,0001	0,08	100,08	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования была разработана и валидирована методика количественного определения сибутрамина в лекарственных препаратах методом КЭ с использованием ультрафиолетового диодноматричного детектора. Разработанная методика позволяет определять сибутрамин, не разделяя вещество на энантиомеры, поскольку это не является целью настоящего исследования. Кроме того, по сравнению с ранее опубликованными методиками предлагаемая нами характеризуется высокой воспроизводимостью результатов. Диапазон линейнос-

ти методики составляет от 80 до 120 %. Данная методика соответствует всем требованиям ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитической методики» и может быть использована для проведения контроля качества лекарственных препаратов, действующим веществом которых является сибутрамин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здравоохранение в России. Федеральная служба государственной статистики. Доступно по: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218>. Ссылка активна на 09.09.2020.
2. Регистр лекарственных средств России. Доступно по: <https://www.rlsnet.ru/> Ссылка активна на 10.09.2020.
3. Лерман О. В., Лукина Ю. В., Кутишенко Н. П., Марцевич С. Ю. Медикаментозное лечение ожирения: особенности врачебных назначений, информированность, приверженность и отношение больных к лекарственной терапии ожирения. *Клиницист*. 2019;13(1-2):27-33.
4. Lean M. E. Sibutramine – a review of clinical efficacy. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 1997;30(6):37-39.
5. Романцова Т. И. Сибутрамин: Эффективность и безопасность применения в рутинной клинической практике. *Ожирение и метаболизм*. 2015;3:18-24.
6. Akamatsu S. Mitsuhashi T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2014;6(5):426-433.
7. Hancu G., Hilochie A., Vlad A. R., Cârje A., Tero-Vescan A. Enantiometric separation of sibutramine by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(6):1116-1120.
8. Lee Y-J., Choi S., Lee J., Nguyen N. T., Lee K., Kang J. S., Mar W., Kim K. H. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archives of Pharmacol Research*. 2012;35(4):671-681.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации 14 издание: официальный текст. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018. Доступно по: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
10. Береговых В. В., ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: Литтерра. 2008: 132 с.

REFERENCES

1. Healthcare in Russia. *Federal State Statistics Service*. Available at: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13218>. Accessed: 09.09.2020. (In Russ.).
2. Register of medicines of Russia. Available at: <https://www.rlsnet.ru/> Accessed: 10.09.2020. (In Russ.).
3. Lerman O. V., Lukina Yu. V., Kutishenko N. P., Martsevich S. Yu. Medical treatment of obesity: peculiarities of medical treatments, information, responsibility and relation to medical treatment of obesity of patients. *Klinitsist = The Clinician*. 2019;13(1-2):27-33. (In Russ.).
4. Lean M. E. Sibutramine – a review of clinical efficacy. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 1997;30(6):37-39.
5. Romantsova T. I. Sibutramine: efficacy and safety of prescribing in routine clinical practice. *Ozhirenie i metabolism*. 2015;3:18-24. (In Russ.).
6. Akamatsu S. Mitsuhashi T. Simultaneous determination of pharmaceutical components in dietary supplements for weight loss by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*. 2014;6(5):426-433.
7. Hancu G., Hilochie A., Vlad A. R., Cârje A., Tero-Vescan A. Enantiometric separation of sibutramine by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2016;27(6):1116-1120.
8. Lee Y-J., Choi S., Lee J., Nguyen N. T., Lee K., Kang J. S., Mar W., Kim K. H. Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Archives of Pharmacol Research*. 2012;35(4):671-681.
9. State Pharmacopoeia of the Russian Federation 14th edition: official text. Moscow: *Federal'naya elektronnyaya medicinskaya biblioteka*, 2018. Available at: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (In Russ.).
10. Beregovykh V. V. Validation of analytical procedures for drug manufacturers. Moscow: *Litterra*, 2008. 132 p.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154>
УДК 615.03



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров^{1*}, И. Е. Шохин¹, М. А. Токарева², О. А. Арчакова¹, Д. С. Богданова¹,
А. В. Алешина¹, Н. С. Багаева¹, В. В. Давыданова¹, Н. П. Садчикова²

1 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

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

*Контактное лицо: Комаров Тимофей Николаевич. E-mail: t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; М. А. Токарева – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>;

О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Д. С. Богданова – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; А. В. Алешина – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>;

Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; В. В. Давыданова – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>; Н. П. Садчикова – <https://orcid.org/0000-0002-3774-5247>.

Статья поступила: 05.10.2020. Статья принята в печать: 10.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В-клеточная неоплазия плазмы клеток является причиной плазмноклеточной миеломы – второго по распространенности злокачественного заболевания системы крови. Помалидомид применяют в качестве терапии плазмноклеточной миеломы в случаях тяжелого течения заболевания и отсутствия эффективности прочих терапий. Помалидомид является структурным аналогом талидомида, он одобрен в России и США в качестве иммуномодулирующего препарата. В настоящее время данные по определению помалидомида в биологических жидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для исследований фармакокинетики практически отсутствуют, а имеющиеся отличаются по условиям детектирования. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения метанолом.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение помалидомида в плазме крови проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков метанолом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая (линейность), точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, предел обнаружения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 1,00–500,00 нг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов помалидомида.

Ключевые слова: помалидомид, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, М. А. Токарева, О. А. Арчакова, Д. С. Богданова, А. В. Алешина участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. М. А. Токарева, Н. П. Садчикова, В. В. Давыданова участвовали в написании текста статьи. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Садчикова Н. П. Разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154>

Development and Validation of Pomalidomide Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS Method

Timofey N. Komarov^{1*}, Igor E. Shohin¹, Margarita A. Tokareva², Olga A. Archakova¹,
Dana S. Bogdanova¹, Alexandra A. Aleshina¹, Natalia S. Bagaeva¹, Veronika V. Davydanova¹,
Natalia P. Sadchikova²

1 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSMU 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.komarov@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Margarita A. Tokareva – <https://orcid.org/0000-0001-7684-358X>;

Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Bogdanova – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>;

Alexandra A. Aleshina – <https://orcid.org/0000-0003-2611-501X>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;

Veronika V. Davydanova – <https://orcid.org/0000-0003-2727-2148>; Natalia P. Sadchikova – <https://orcid.org/0000-0002-3774-5247>.

Received: 05.10.2020. Revised: 10.11.2020. Published: 24.11.2020

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Садчикова Н. П., 2020

© Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P., 2020

Abstract

Introduction. B-cell malignancies of the plasma cell leads to the second most spread hematological malignancy disease, called multiple myeloma. Pomalidomide is used in case of previous multiple myeloma ineffective treatment. Pomalidomide is a thalidomide synthetic derived, approved as immunomodulatory drug by the Food and Drug Administration (FDA). Nowadays, detection of pomalidomide in blood plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) is not spread. Moreover, the detection and the experimental setting accumulated data are varying greatly. This investigation provides development and validation of pomalidomide aiming to determine human blood plasma by HPLC-MS/MS method. The samples were processed by methanol protein precipitation.

Aim. The aim of this study is to develop a method for the pomalidomide in human plasma by HPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of pomalidomide in plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by methanol protein precipitation.

Results and discussion. This method was validated by next parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, lower limit of quantification, detection limit, carry-over and stability.

Conclusion. The method of the determination of pomalidomide in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 1,00 – 500,00 ng/ml. Method could be applied to pomalidomide determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: pomalidomide, plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Margarita A. Tokareva, Olga A. Archakova, Dana S. Bogdanova, Alexandra A. Aleshina have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor S. Shohin carried out the organization of work in this direction. Margarita A. Tokareva, Natalia P. Sadchikova, Veronika V. Davydanova participated in writing the text of this article. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

For citation: Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Sadchikova N. P. Development and validation of pomalidomide determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-146-154>

ВВЕДЕНИЕ

Развитие медицины привело к возможности лечения заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. В последнее время множество исследований проводятся в направлении терапии злокачественных новообразований. В-клеточная неоплазия плазмы клеток является причиной плазмоклеточной миеломы – второго по распространенности злокачественного заболевания системы крови. Для лечения данного заболевания используются препараты, производные талидомида [1].

Помалидомид – иммуномодулятор второго поколения, производное талидомида. Его применяют в качестве терапии плазмоклеточной миеломы в случае развития опухоли и отсутствии эффективности терапии леналидомидом и бортезомибом [2]. Механизм действия препарата заключается в стимулировании работы Т-клеток и природных киллеров, индуцировании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. К тому же было обнаружено комплексное воздействие вещества на плазмоклеточную миелому [3].

Помалидомид – (R,S)-4-Амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион – иммуномодулирующий препарат, одобренный в России и США (рисунок 1) [2].

В литературных данных представлено большое количество методик определения помалидомида в плазме крови различными методами, например: спектрофлуориметрия [2], высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим и ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-ФЛД/УФ) [4], высокоэффективная жидкостная хроматография с

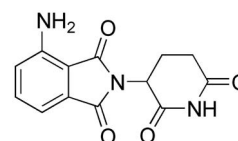


Рисунок 1. Структурная формула помалидомида

Figure 1. Chemical structure of pomalidomide

тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [5], сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [6, 7]. В качестве пробоподготовки используются способы осаждения белков ацетонитрилом [2, 5] и жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) [4, 6, 7]. Данные представлены в таблице 1.

Следует отметить, что разработка простой и эффективной методики определения помалидомида в плазме крови человека является необходимой для будущих исследований биоэквивалентности препарата, поскольку, как показал анализ литературы, в настоящее время данные по определению помалидомида в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС для исследований фармакокинетики практически отсутствуют, а имеющиеся отличаются по условиям детектирования.

В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения метанолом.

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения помалидомида

Table 1. Bioanalytical methods of pomalidomide quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Пробоподготовка Sample preparation	Источник ионизации и ионизация Ionization source and ionization	Аналитический диапазон, нг/мл Analytical range, ng/ml	Ссылка Reference
Спектрофлуориметрия Spectrofluorimetry	Плазма крови человека Human blood plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	–	31,00–500,00	[2]
ВЭЖХ-ФЛД/УФ HPLC-FLD/UV	Плазма крови человека Human blood plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	–	1,00–500,00	[4]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови мыши Mouse blood plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	Химическая ионизация при атмосферном давлении; положительная Atmospheric-pressure chemical ionization; positive	0,08–819,73	[5]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови мыши Mouse blood plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	Ионизация электроспреем; отрицательная Electrospray ionization; negative	0,47–400,00	[6]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human blood plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	Ионизация электроспреем; отрицательная Electrospray ionization; negative	10,00–1009,65	[7]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащённом градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и tandemным масс-спектрометрическим детектором (тройным квадруполем). Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation, Япония.

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «UHPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), муравьиная кислота (класс «for LC-MS», Merck Millipore, США), вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы помалидомида (Sigma Aldrich, количественное содержание 99,5 %) и леналидомида (Sigma Aldrich, количественное содержание 99,0 %).

Исходные стандартные растворы помалидомида и внутреннего стандарта (ВС) леналидомида готовили путем растворения навески субстанций в метаноле, рабочие стандартные растворы готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций.

Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –45 °С. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –45 °С.

Пробоподготовка

К 300 мкл калибровочного образца, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС леналидомида, затем прибавляли 600 мкл метанола, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические флаконы и помещали в автосамплер хроматографа (таблица 2).

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Kinetex™ C18, 150 × 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 метаноле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы представлен в таблице 3.
- Объем вводимой пробы: 10 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–5,00 мин.
- Параметры источника ионизации (химическая ионизация при атмосферном давлении): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 5 л/мин, блок нагрева 300 °С, линия десольватации 200 °С, напряжение на капилляре +5,0 кВ.
- Режим ионизации: положительный.

- Время удерживания помалидомида: около 2,4 мин.
- Время удерживания леналидомида: около 2,1 мин.
- Условия детектирования помалидомида: 274,15 → 84,10 m/z.
- Условия детектирования леналидомида: 260,10 → 149,15 m/z.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на каждом калибровочном уровне

Table 2. Concentrations of analytes at calibration levels

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml	Концентрация внутреннего стандарта, нг/мл Internal standard concentration, ng/ml
	помалидомид pomalidomide	леналидомид lenalidomide
1	1,00	3,00
2	3,00	3,00
3	10,00	3,00
4	25,00	3,00
5	50,00	3,00
6	100,00	3,00
7	250,00	3,00
8	400,00	3,00
9	500,00	3,00

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min
0,00	93,00	7,00	1,00
1,00	93,00	7,00	
2,50	0,00	100,00	
3,10	0,00	100,00	
3,20	93,00	7,00	
5,00	93,00	7,00	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

В процессе литературного поиска было отмечено несколько различных подходов к детектированию исследуемого вещества, при этом эти подходы зачастую противоречили друг другу. На основании опубликованных данных в процессе разработки методики были оценены различные способы детектирования, в том числе различные способы ионизации при масс-спектрометрическом детектировании (тройной квадруполь). Так, применение ионизации электроспреем в положительной и отрицательной полярностях не позволило достичь требуемой чувствительности. Применение химической ионизации при атмосферном давлении в режиме отрицательной полярности позволило достичь чувствительности в целом сопоставимой с применением флуориметрического детектирования. При этом масс-селективное детекти-

рование обеспечило гораздо более высокую селективность, а также позволило сократить время анализа за счёт значительно меньшего влияния фоновых компонентов плазмы.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств [8], а также руководств FDA [9] и EMA [10] по следующим параметрам:

- селективность;
- эффект матрицы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- степень извлечения;
- нижний предел количественного определения и предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность (стабильность исходных стандартных растворов аналита и ВС; краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов интактной плазмы крови, полученных из разных источников, а также образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации помалидомида 1,00 нг/мл. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и образцов с повышенным содержанием липидов. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания исследуемого вещества и ВС, не превышают 20 % от сигнала на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала внутреннего стандарта соответственно (таблица 4). Соответствующие хроматограммы приведены ниже на рисунках 2, 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов помалидомида и леналидомида без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения помалидомида и леналидомида из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на нижнем (L) (таблица 5, № 3) и верхнем (H) уровнях (таблица 5, № 8) аналитического диапазона концентраций помалидомида. Для внутреннего стандарта леналидомида эффект матрицы был рассчитан на уровне 3,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 4. Оценка селективности методики определения помалидомида и леналидомида

Table 4. Selectivity assessment of pomalidomide and lenalidomide determination

	Значение площади Area value		Отношение площадей, % Area ratio, %		Селективность Selectivity	
	помалидомид pomalidomide	ленолидамид lenolidamide	помалидомид pomalidomide	ленолидамид lenolidamide	критерий приемлемости acceptance criteria	соответствие критерию приемлемости compliance acceptance criteria
НПКО интактная плазма Lower limit of quantification, blank plasma	1015	37815	–	–	Сигнал аналита образца не превышает 20 % от сигнала на уровне НПКО. Сигнал ВС образца не превышает 5 % от сигнала ВС Analyte signal is less than 20 % of the signal at the lower limit of quantitation. Internal standard signal is less than 5 % of sample internal standard signal	–
НПКО гемолизная плазма Lower limit of quantification, hemolyzed plasma	973	36213	–	–		–
НПКО гиперлипидемическая плазма Lower limit of quantification, lipemic plasma	968	36086	–	–		–
Интактная плазма 1 Blank plasma 1	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма 2 Blank plasma 2	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма 3 Blank plasma 3	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма 4 Blank plasma 4	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма 5 Blank plasma 5	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма 6 Blank plasma 6	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма гиперлипидемическая 1 Lipemic blank plasma 1	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма гиперлипидемическая 2 Lipemic blank plasma 2	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма гемолизная 1 Hemolyzed blank plasma 1	0	0	0,00	0,00		да yes
Интактная плазма гемолизная 2 Hemolyzed blank plasma 2	0	0	0,00	0,00		да yes

Калибровочная кривая

Проводили анализ девяти образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС леналидомида и рабочего стандартного раствора помалидомида до концентраций, указанных в таблице 2. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика помалидомида к площади пика леналидомида

от отношения концентрации помалидомида к концентрации леналидомида в плазме крови, приведенные на рисунке 4 совместно с уравнением калибровочной кривой и коэффициентами корреляции.

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.

Sample Name : Blank_01
Month-Day Acquired : 05.12.2019
Time Acquired : 18:32:02
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

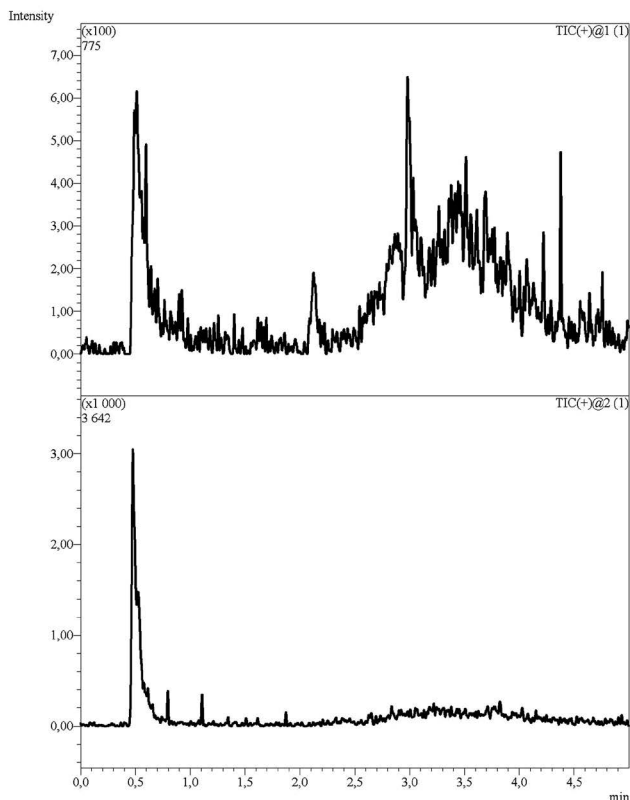


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Blank plasma sample chromatogram

Таблица 5. Расчёт фактора матрицы помалидомида, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 5. The matrix factor of pomalidomide calculations, normalized by the internal standards matrix factor

№	Mf помалидомида на уровне L Mf of pomalidomide, level L	Mf леналидомида Mf lenalidomide	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	Mf помалидомида на уровне H Mf of pomalidomide, level H	Mf леналидомида Mf lenalidomide	Нормализованный Mf (H) Normalized Mf (H)
1	0,94	1,11	0,84	0,98	1,12	0,87
2	0,93	1,15	0,81	0,98	1,08	0,91
3	1,16	1,14	1,02	0,99	1,09	0,91
4	1,04	1,18	0,88	1,01	1,14	0,88
5	1,03	1,17	0,88	1,00	1,11	0,90
6	0,95	1,20	0,79	0,99	1,14	0,86
Среднее Average			0,87	Среднее Average		0,89
CV, %			9,22	CV, %		2,15

Sample Name : QC_1_LLOQ_03
Month-Day Acquired : 05.12.2019
Time Acquired : 21:03:46
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

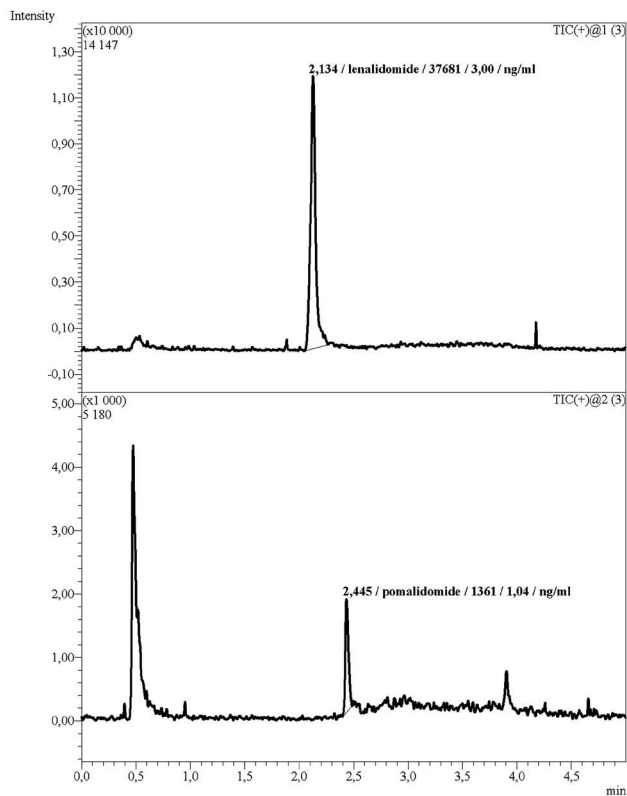


Рисунок 3. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень № 1 (таблица 2)

Figure 3. Chromatogram of plasma sample level № 1 (table 2)

Batch : C:\LabSolutions\Data\pomalidomide\val\val.lcb
Name : pomalidomide
Quantitative Method : Internal Standard
Function : f(x)=0,0290879*x+0,0260614
Rr1=0,9965077 Rr2=0,9930276
FitType : Linear

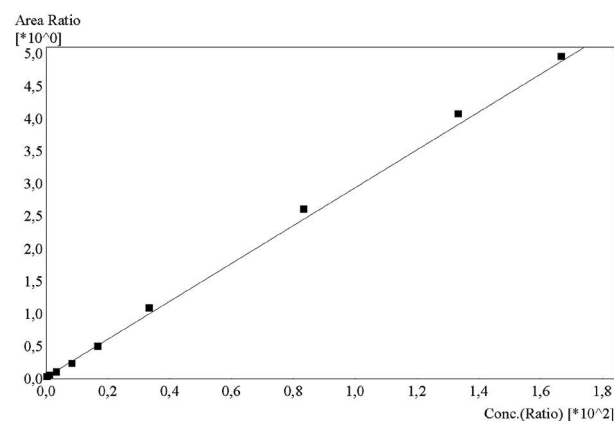


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости отношения площади пика помалидомида к площади пика леналидомида от отношения концентрации помалидомида к концентрации леналидомида в плазме крови

Figure 4. The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of pomalidomide to the lenalidomide on the concentration ratio of pomalidomide to the lenalidomide in plasma

Таблица 6. Отклонения концентраций анализируемых веществ в калибровочных образцах от их номинальных значений

Table 6. Analyte samples concentrations deviations from their nominal calibration parameters

№	Концентрация помалидомида номинальная, нг/мл Nominal pomalidomide concentration, ng/ml	Концентрация леналидомида рассчитанная, нг/мл Measured lenalidomide concentration, ng/ml	E, %	Норма, не более, % Rate, no more, %
1	1,00	1,00	0,00	20,00
2	3,00	3,11	3,67	15,00
3	10,00	8,72	-12,80	15,00
4	25,00	22,00	-12,00	15,00
5	50,00	49,10	-1,80	15,00
6	100,00	110,00	10,00	15,00
7	250,00	266,25	6,50	15,00
8	400,00	417,56	4,39	15,00
9	500,00	508,63	1,73	15,00

Точность и прецизионность

Проводили анализ калибровочных образцов плазмы крови, соответствующих уровням: НПКО, низкий уровень (L) (таблица 2, № 3), средний уровень (M) (таблица 2, № 7), верхний уровень (H) (таблица 2, № 8). Анализ образцов проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность 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.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относитель-

ной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы без влияния степени извлечения, на низком, среднем и высоком уровнях, а также образцы контроля качества для оценки степени извлечения. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. Оценка степени извлечения помалидомида на уровнях L, M, и H из различных биологических матриц

Table 8. Calculation of pomalidomide spike recovery at L, M, H levels for biological matrix

	Степень извлечения помалидомида на уровне L, % Recovery, level L	Степень извлечения помалидомида на уровне M, % Recovery, level M	Степень извлечения помалидомида на уровне H, % Recovery, level H
Плазма крови Plasma	101,46	42,80	100,96
	86,22	39,15	95,48
	100,03	41,87	102,95
Плазма, полученная из крови, подвергшейся гемолизу Hemolyzed plasma	113,28	37,11	108,49
	124,50	34,95	116,51
	116,05	35,14	112,31
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic plasma	104,71	35,86	117,43
	108,40	33,15	128,15
	103,27	34,24	121,51
Среднее Mean	106,44	37,14	111,53
SD, %	10,94	3,41	10,54
RSD, %	10,28	9,19	9,45

Таблица 7. Точность и прецизионность методики

Table 7. Accuracy and precision of the method

Введено (нг/мл) Spiked (ng/ml)	Найдено (нг/мл), среднее значение Found (ng/ml), mean			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)
<i>помалидомид pomalidomide</i>												
1,00	0,99	1,00	0,99	0,04	0,07	0,10	4,20	6,96	10,55	-1,20	-0,40	-1,20
3,00	2,88	2,96	2,97	0,31	0,33	0,26	10,72	11,09	8,85	-4,00	-1,50	-0,89
250,00	277,01	274,51	276,54	6,85	7,66	12,61	2,47	2,79	4,56	10,80	9,80	10,62
400,00	431,99	437,34	441,74	8,73	11,80	22,25	2,02	2,70	5,04	8,00	9,33	10,43

Степень извлечения не должна быть равной 100 %, но необходимо обеспечить эффективное и воспроизводимое извлечение веществ из биологической матрицы. Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения аналита из биологических матриц не должно превышать 15 %.

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 помалидомида в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которого возможно количественное определение помалидомида со значениями RSD и E не более 20 %. Нижний предел количественного определения методики составил 1,00 нг/мл. Отношение сигнал/шум по пику помалидомида на уровне НПКО составляет 14,78. Предел обнаружения помалидомида для данной методики составил около 0,20 нг/мл (отношение сигнал/шум 3,00).

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настоящая» и «постпрепаративная»), стабильность при 3-кратной заморозке-разморозке, стабильность стандартных растворов (при хранении в течение 62 дней при температуре –45 °C), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 62 дней при температуре –45 °C) исследуемых веществ на нижнем и верхнем уровнях концентраций.

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца с наибольшей концентрацией и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемого вещества и ВС. Хроматограмма образца на уровне ВПКО представлена на рисунке 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения помалидомида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составили 1,00–500,00 нг/мл помалидомида в плазме крови человека. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов помалидомида.

Sample Name : Cal 1.9
Month-Day Acquired : 05/12/2019
Time Acquired : 20:41:21
Sample Type : Standard
Injection Volume : 10
Method File : poma_quant.lcm

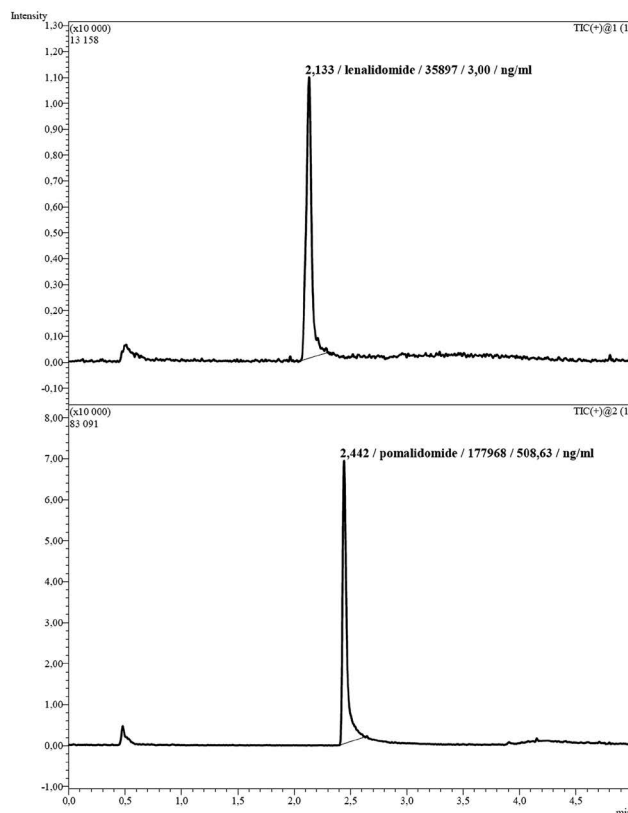


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень № 9 (таблица 2)

Figure 5. Chromatogram of plasma sample level № 9 (table 2)

ЛИТЕРАТУРА

- Neşetoglu N., Kaplan C., Aslan S. S., Ünal D. Ö. A Simple and Rapid LC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Lenalidomide. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*. 2020;21(1):19–26. DOI: 10.21743/pjaec/2020.06.03.
- Aydoğmuş Z., Yılmaz E. M., Yildiz G. A simple and rapid spectrofluorometric determination of pomalidomide in spiked plasma and urine. Application to degradation studies. *Luminescence*. 2019;35(4):1–12. DOI: 10.1002/bio.3748.
- Hoffmann M., Kasserra C., Reyes J., Schafer P., Kosek I., Capone L., Parton A., Kim-Kang H., Surapaneni S., Kumar G. Absorption, metabolism and excretion of [14C]pomalidomide in humans following oral administration. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013;71(2):489–501. DOI: 10.1007/s00280-012-2040-6.
- Shahbazi S., Peer C. J., Polizzotto M. N., Uldrick T. S., Roth J., Wyvill K. M., Aleman K., Zeldis J. B., Yarchoan R., Figg W. D. A sensitive and robust HPLC assay with fluorescence detection for the quantification of pomalidomide in human plasma for pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;92:63–68. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.001.
- Jiang Y., Wang J., Rozewski D. M., Kolli S., Wu C., Chen C., Yang X., Hofmeister C. C., Byrd J. C., Johnson A. J. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry methods for quantification of pomalidomide in mouse plasma and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;88:26–268. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.036.

6. Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Shakeel F. A validated UPLC-MS/MS assay using negative ionization mode for high-throughput determination of pomalidomide in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;983-984:76–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.036.
7. Vasanth D. A., Rajkamal B. A UPLC-MS/MS method development and validation for the estimation of pomalidomide from human plasma. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):37–43. DOI: 10.22159/ijap.2017v9i1.15653.
8. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К, 2013. 280 с.
9. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
10. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.
4. Shahbazi S., Peer C. J., Polizzotto M. N., Uldrick T. S., Roth J., Wyvill K. M., Aleman K., Zeldis J. B., Yarchoan R., Figg W. D. A sensitive and robust HPLC assay with fluorescence detection for the quantification of pomalidomide in human plasma for pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;92:63–68. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.01.001.
5. Jiang Y., Wang J., Rozewski D. M., Kolli S., Wu C., Chen C., Yang X., Hofmeister C. C., Byud J. C., Johnson A. J. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry methods for quantification of pomalidomide in mouse plasma and brain tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;88:26–268. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.036.
6. Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K. A., Shakeel F. A validated UPLC-MS/MS assay using negative ionization mode for high-throughput determination of pomalidomide in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015;983-984:76–82. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.12.036.
7. Vasanth D. A., Rajkamal B. A UPLC-MS/MS method development and validation for the estimation of pomalidomide from human plasma. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(1):37–43. DOI: 10.22159/ijap.2017v9i1.15653.
8. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. V. II. Moscow: Grif and K, 2013. 280 p. (In Russ.).
9. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
10. European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-155-163>
УДК 615.038



Оригинальная статья/Research article

Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап АМ® (телмисартан/амлодипин) и совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан) и Норваск® (амлодипин) с участием здоровых добровольцев

В. Кубеш¹, А. Л. Хохлов^{2,6}, А. М. Шитова², Ю. А. Джурко², В. И. Казей^{3*}, А. А. Хохлов⁴, А. Е. Мирошников⁴, О. В. Лебедева⁵, И. К. Клаус⁵, А. В. Зятенков⁵

1 – Квинта-Аналитика s.r.o (QUINTA-ANALYTICA S.R.O.), Чешская республика, г. Прага, Pražská, 1486/18c, 102 00
2 – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», 150045, Россия, г. Ярославль, Ленинградский пр-т, д. 52Г
3 – ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2
4 – ООО «КлинФармИнвест», 150031, Россия, г. Ярославль, ул. Угличская, д. 68
5 – Представительство АО «Санофи-авентис груп» (Франция), 125009, Россия, г. Москва, ул. Тверская, д. 22
6 – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» (ЯГМУ), 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

*Контактное лицо: Казей Василий И. E-mail: Vasily.kazey@exactelabs.com

ORCID: В. Кубеш – <https://orcid.org/0000-0001-7614-6098>; А. Л. Хохлов – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>; А. М. Шитова – <https://orcid.org/0000-0003-3546-7316>;
Ю. А. Джурко – <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>; В. И. Казей – <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>; А. А. Хохлов – <https://orcid.org/0000-0002-3307-0705>;
А. Е. Мирошников – <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>; О. В. Лебедева – <https://orcid.org/0000-0002-7983-685X>; И. К. Клаус – <https://orcid.org/0000-0002-7593-265X>;
А. В. Зятенков – <https://orcid.org/0000-0002-3655-9645>.

Статья поступила: 29.07.2020. Статья принята в печать: 17.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Фиксированная комбинация телмисартана и амлодипина широко используется в клинической практике при терапии артериальной гипертензии. Для данных веществ характерен эффект потенцирования при снижении артериального давления. В рамках регистрации комбинированного препарата Телзап АМ (Telzap АМ) было проведено исследование его биоэквивалентности совместно принимаемым монокомпонентным препаратом Микардис® и Норваск® с участием 60 здоровых добровольцев.

Цель. Целью настоящего исследования являлось сравнительное изучение фармакокинетики и подтверждение биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия) и Норваск® (амлодипин, таблетки 10 мг, Пфайзер Эйч.Си.Пи. Корпорэйшн (США), Россия) у здоровых добровольцев после однократного приема натощак.

Материалы и методы. Для подтверждения биоэквивалентности было проведено открытое, сравнительное, рандомизированное, перекрестное клиническое исследование с четырьмя этапами. В ходе исследования у добровольцев отбирались образцы плазмы крови, в которых при помощи валидированной ВЭЖХ-МС/МС методики определялись концентрации амлодипина и телмисартана. На основании полученных данных был проведен фармакокинетический и статистический анализ и рассчитаны доверительные интервалы (ДИ) для фармакокинетических параметров C_{max} и AUC_{0-72} .

Результаты и обсуждение. На основании результатов статистического и фармакокинетического анализа было показано, что фармакокинетические параметры сравниваемых препаратов характеризуются высоким сходством в отношении как амлодипина, так и телмисартана. Для всех оцениваемых фармакокинетических параметров амлодипина 90%-ые ДИ находились в пределах 80–125 %. В случае телмисартана 90%-ые ДИ для AUC_{0-72} находились в пределах 80–125 % и для C_{max} в пределах 76,73–130,32 %.

Заключение. Таким образом, согласно применяемым критериям, препараты признаны биоэквивалентными.

Ключевые слова: телмисартан, амлодипин, фармакокинетика, биоэквивалентность.

Конфликт интересов. Исследование спонсировалось АО «Санофи-авентис груп». Авторы О. В. Лебедева, И. К. Клаус, А. В. Зятенков являются сотрудниками данной компании. Авторы В. Кубеш, А. Л. Хохлов, А. М. Шитова, А. А. Хохлов представляют компании ООО «Квинта-Аналитика Ярославль» и ООО «КлинФармИнвест», выполнявшие данное контрактное исследование для АО «Санофи-авентис груп». Авторы В. И. Казей, А. Е. Мирошников заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все применяемые процедуры соответствовали этическим нормам и Хельсинкской декларации 1964 года также ее более поздним поправкам, и были разрешены Советами по этике (национальным и локальным). Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Вклад авторов. А. В. Зятенков, О. В. Лебедева, И. К. Клаус координировали все этапы исследования биоэквивалентности. В. Кубеш, А. Л. Хохлов, А. А. Хохлов, А. Е. Мирошников руководили клиническим этапом исследования. Ю. А. Джурко отвечал за аналитическую часть исследования. А. М. Шитова отвечала за статистическую обработку. В. И. Казей участвовал в оформлении рукописи.

Для цитирования: Кубеш В., Хохлов А. Л., Шитова А. М., Джурко Ю. А., Казей В. И., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Клаус И. К., Зятенков А. В. Исследование фармакокинетики и биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап АМ® (телмисартан/амлодипин) и совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан) и Норваск® (амлодипин) с участием здоровых добровольцев. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-155-163>

© Кубеш В., Хохлов А. Л., Шитова А. М., Джурко Ю. А., Казей В. И., Хохлов А. А., Мирошников А. Е., Лебедева О. В., Клаус И. К., Зятенков А. В., 2020

© Kubesh V., Khokhlov A. L., Shitova A. M., Dzhurko Yu. A., Kazey V. I., Khokhlov A. A., Miroshnikov A. E., Lebedeva O. V., Klaus I. K., Ziatenkov A. V., 2020

Pharmacokinetic and Bioequivalence Study of Telzap AM® (Telmisartan/amlodipine Fixed-dose Combination) and Coadministered Mikardis® (Telmisartan) and Norvask® (Amlodipine) in Healthy Subjects

Vladimir Kubesh¹, Alexander L. Khokhlov^{2,6}, Anastasia M. Shitova², Yuri A. Dzhurko²,
Vasily I. Kazey^{3*}, Alexander A. Khokhlov⁴, Alexey E. Miroshnikov⁴, Olga V. Lebedeva⁵, Inga K. Klaus⁵,
Alexey V. Zyatenkov⁵

1 – QUINTA-ANALYTICA S.R.O., 1486/18c, 102 00, Pražská, Praha, Czech Republic

2 – LLC «Quinta-Analytics Yaroslavl», 52f, Leningradskiy avenue, Yaroslavl, 150045, Russia

3 – LLC «ExacteLabs», 20/2, Nauchnyi proezd, Moscow, 117246, Russia

4 – LLC «ClinPharmInvest», 68, Uglichsкая, Yaroslavl str., 150031, Russia

5 – Representative office of Sanofi-aventis group JSC (France), 22, Tverskaya str., Moscow, 125009, Russia

6 – Yaroslavl State Medical University, 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

*Corresponding author: Vasily I. Kazey. E-mail: Vasily.kazey@exactelabs.com

ORCID: Vladimir Kubesh – <https://orcid.org/0000-0001-7614-6098>; Alexander L. Khokhlov – <https://orcid.org/0000-0002-0032-0341>;

Anastasia M. Shitova – <https://orcid.org/0000-0003-3546-7316>; Yuri A. Dzhurko – <https://orcid.org/0000-0002-5901-8120>; Vasily I. Kazey – <https://orcid.org/0000-0003-2032-6289>;

Alexander A. Khokhlov – <https://orcid.org/0000-0002-3307-0705>; Alexey E. Miroshnikov – <https://orcid.org/0000-0001-6657-3950>;

Olga V. Lebedeva – <https://orcid.org/0000-0002-7983-685X>; Inga K. Klaus – <https://orcid.org/0000-0002-7593-265X>; Alexey V. Zyatenkov – <https://orcid.org/0000-0002-3655-9645>.

Received: 29.07.2020. Revised: 17.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. A fixed dose combination of telmisartan and amlodipine is widely used in clinical practice during hypertension treatment. Combination of telmisartan and amlodipine demonstrates potentiating synergistic effect on blood pressure decrease. A bioequivalence study of Telzap® AM with coadministered Mikardis® and Norvask® was conducted with 60 volunteers.

Aim. The purpose of the bioequivalence trial was a comparative study of the pharmacokinetics and evidence of the bioequivalence of the fixed dose combination drug product Telzap® AM (telmisartan + amlodipine, tablets, 80 + 10 mg, Zentiva ks company, Czech Republic) and coadministered monocomponent drug products Mikardis® (telmisartan, tablets 80 mg, Beringer Ingelheim International GmbH, Germany) and Norvask® [amlodipine, tablets 10 mg, Pfizer HCP Corporation (USA), Russia] in healthy volunteers after a single administration under fasting.

Materials and methods. To prove bioequivalence, an open label, comparative, randomized, crossover four-period replicate clinical trial was conducted. The concentrations of amlodipine and telmisartan in plasma samples were determined by a validated HPLC-MS/MS method. A pharmacokinetic and statistical analysis was performed and confidence intervals for the pharmacokinetic parameters C_{max} and AUC_{0-72} were calculated.

Results and discussion. It can be concluded that the studied formulations are bioequivalent in terms of pharmacokinetic parameters of amlodipine and telmisartan. All 90 % confidence intervals for the estimated pharmacokinetic parameters of amlodipine were in the range of 80–125 %, 90 % confidence intervals for telmisartan were within the bioequivalence range of 80–125 % for AUC_{0-72} and 76.73–130.32 % for C_{max} .

Conclusion. Thus, according to the criteria used in the study, the formulations are proved to be bioequivalent.

Keywords: telmisartan, amlodipine, pharmacokinetics, bioequivalence.

Conflict of interest. The study was sponsored by Sanofi and authors Olga V. Lebedeva, Inga K. Klaus, Alexey V. Zyatenkov are employees of Sanofi. Authors Vladimir Kubesh, Alexander L. Khokhlov, Anastasia M. Shitova, Yuri A. Dzhurko, Alexander A. Khokhlov represent Quinta-Analytica Yaroslavl LLC and KlinFarmInvest which were contracted by Sanofi for the conduction of the current study. Authors Vasily I. Kazey, Alexey E. Miroshnikov declares that they have no conflict of interest.

All procedures applied were in accordance with ethical standards and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments, and were authorized by Ethics Councils (national and local). Informed consent was obtained from all subjects in the study.

Contribution of the authors. Alexey V. Zyatenkov, Olga V. Lebedeva, Inga K. Klaus coordinated all stages of the bioequivalence study, Vladimir Kubesh, Alexander L. Khokhlov, Alexander A. Khokhlov, Alexey E. Miroshnikov were responsible for the clinical phase of the study, Yuri A. Dzhurko carried out the analytical part of the study, Anastasia M. Shitova carried out the statistical part of the study, Vasily I. Kazey wrote the text of the manuscript.

For citation: Kubesh V., Khokhlov A. L., Shitova A. M., Dzhurko Yu. A., Kazey V. I., Khokhlov A. A., Miroshnikov A. E., Lebedeva O. V., Klaus I. K., Zyatenkov A. V. Pharmacokinetic and bioequivalence study of Telzap AM® (telmisartan/amlodipine fixed-dose combination) and coadministered Mikardis® (telmisartan) and Norvask® (amlodipine) in healthy subjects. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-155-163>

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия является одним из главных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Снижение артериального давления за счёт эффективной фармакотерапии значительно снижает риск развития ССЗ и уменьшает количество смертельных исходов [1].

В ряде клинических исследований было показано, что комбинация действующих веществ разного механизма действия (как правило, это блокато-

ры кальциевых каналов, антагонисты ангиотензина II и диуретики) позволяет значительно эффективнее контролировать АД, чем высокодозовая монотерапия [2, 3]. Фиксированная комбинация телмисартана и аmlодипина широко используется в клинической практике при терапии артериальной гипертензии. Оба действующих вещества имеют взаимодополняющие механизмы действия для снижения артериального давления (АД): телмисартан, являясь антагонистом рецепторов ангиотензина II (АРА II), снижает его вазопрессорное действие, а аmlодипин как блока-

тор «медленных» кальциевых каналов (БМКК) обладает прямым вазодилатирующим влиянием на гладкие мышцы сосудов. Комбинация данных препаратов проявляет аддитивный антигипертензивный эффект, вызывая более выраженное снижение АД, чем каждый из компонентов препарата по отдельности [4]. Их совместное действие обеспечивает контроль показателей АД у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией.

Важным преимуществом фиксированных комбинаций перед совместно применяемыми монопрепаратами является простота приёма (одна таблетка вместо двух), особенно в случаях, когда пациент вынужден самостоятельно принимать большое количество различных препаратов.

Лекарственный препарат Телзап АМ®, которому посвящено данное исследование, является воспроизведённым. Как правило, стоимость воспроизведённых лекарственных средств ниже оригинальных, что обеспечивает доступ к современным препаратам людям, которые не могут позволить себе дорогостоящее лечение. Во многом именно этим объясняется столь высокая популярность воспроизведённых лекарственных препаратов и исследований биоэквивалентности в России и в мире. Эквивалентность воспроизведённого препарата оригинальному обычно доказывают в рамках исследования биоэквивалентности, в которых демонстрируется, что оба лекарственных средства имеют одинаковую скорость и степень абсорбции [5]. Такие исследования призваны подтвердить, что воспроизведённые лекарственные средства терапевтически эквивалентны референсным лекарственным средствам, то есть обладают той же эффективностью и безопасностью, что и референсный препарат. В настоящей работе исследование биоэквивалентности проводилось для двухкомпонентного препарата телмисартана и амлодипина относительно двух совместно принимаемых препаратов телмисартана и амлодипина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этические принципы

Данное исследование проводилось в соответствии с протоколом, принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциации, стандартами по Надлежащей клинической практике (ICH GCP), а также в соответствии с другими законодательствами. Участие добровольцев в исследовании являлось добровольным. Доброволец имел право отказаться от участия в проводимом исследовании на любой его стадии. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводил Совет по этике при Министерстве здравоохранения и локальный этический комитет (ЛЭК). Одобрение Протокола версии 2.0 было подтверждено выпиской из протокола заседания Совета по этике № 121 от 22 марта 2016 г. Разрешение на проведение клинического исследо-

вания было выдано Министерством здравоохранения РФ № 243 от 11 апреля 2016 года по результатам экспертизы документов, необходимых для получения разрешения на проведение исследования и этической экспертизы, проводимых в порядке, установленном статьей 20 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Все одобренные документы были получены до выполнения добровольцами каких-либо процедур исследования, включая тесты скрининга для оценки пригодности.

Дизайн Исследования

Данное исследование биоэквивалентности являлось открытым, сравнительным, рандомизированным, перекрестным клиническим исследованием с четырьмя этапами по оценке биоэквивалентности двухкомпонентного препарата Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг) относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг) и Норваск® (амлодипин, таблетки 10 мг) при однократном повторном приеме внутрь здоровыми добровольцами одной дозы каждого из них.

Всего было отобрано 98 человек, 61 доброволец был рандомизирован (с учетом 1 выбывшего до дозирования в первом периоде добровольца); 10 человек приняли участие в исследовании в качестве дублеров. Один дублёр заменил выбывшего добровольца основного состава в первом периоде, остальные приняли участие в качестве добровольцев основного состава во время госпитализации второй подгруппы. Во время госпитализации добровольцев второй подгруппы дополнительно было госпитализировано 5 дублеров. 32 случая признаны скрининговыми неудачами: были обнаружены отклонения в лабораторных показателях, которые не позволили им принять участие в исследовании.

В первом периоде препарат приняли 60 человек, во втором – 58 человек, в третьем – 58 человек, в четвертом – 58 человек.

Средний возраст рандомизированных добровольцев и дублеров составил $28,0 \pm 9,2$ лет; рост $173,6 \pm 8,9$ см; вес $70,6 \pm 10,5$ кг; средний индекс массы тела $23,3 \pm 2,7$ кг/м².

Все добровольцы были разделены на 2 группы: А и Б. Каждый доброволец был отнесен (рандомизирован) к одной из групп с определенной последовательностью приема препаратов: RTRT или TRTR. Добровольцы, включенные в группу А, в первом и третьем периоде исследования получали исследуемый препарат (Т), а представители группы Б – препарат сравнения (R).

Во втором и четвертом периодах исследования назначение препарата было обратным: представители группы А получали препарат сравнения (R), а представители группы Б – исследуемый препарат (Т). Это означало, что группа А получала лекарственный

препарат в последовательности TRTR, а группа Б получала лекарственный препарат в последовательности RTRT. Таким образом, общая схема исследования была «TRTR | RTRT».

По причине вместимости клинического отдела добровольцы были разделены на 2 подгруппы по 30 человек. Добровольцы каждой подгруппы находились в том же клиническом центре, следовали одинаковым процедурам и требованиям протокола. Получение препарата и манипуляции с кровью проводились в одинаковых условиях (включая, но не ограничиваясь использованием одинакового типа и производства внутривенных катетеров, игл, одинаковых систем дезинфекции, типов лабораторных и транспортных пробирок, морозильных камер и т. д.).

Все добровольцы из обеих подгрупп получали одинаковую пищу в каждом из периодов госпитализации, соблюдался единый интервал времени между периодами (период «отмывания»).

Исследуемые препараты

Действующими веществами исследуемого препарата и препарата сравнения являются телмисартан и амлодипин. В качестве препаратов сравнения (референсных, R) использовались:

- Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия, номер серии 305859В).
- Норваск® [амлодипин, таблетки 10 мг, Пфайзер Эйч.Си.Пи. Корпорэйшн (США), Россия, номер серии E10202831].

Данные препараты принимались одновременно.

В качестве исследуемого препарата (тест, T) использовался:

- Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика, номер серии G850316).

Введение препарата и отбор образцов

В соответствии с законодательной и нормативно-базой исследование было выполнено с предоставленными спонсором образцами исследуемого препарата и препаратов сравнения. Исследуемый препарат применялся внутрь в дозе 80 + 10 мг (1 таблетка), препараты сравнения принимались в аналогичной дозировке, каждый препарат в составе отдельной таблетки. Доброволец запивал таблетки 200 мл воды.

Образцы крови отбирались с помощью катетера, установленного в вену предплечья в течение 16 часов после приема препарата. Начиная со второго взятия крови, перед каждой точкой забора крови из катетера 1 мл крови удалялся для исключения попадания гепарина в образец крови. После каждого забора крови из катетера он промывался 0,5 мл гепаринизированного физиологического раствора (500 МЕ на 100 мл 0,9 % натрия хлорида) во избежание его тромбирования. Катетер был удален после взятия образцов крови через 16 часов после приема препарата. Образцы кро-

ви в точке 24, 48 и 72 часа отбирались путем прямой венопункции. Отбор образцов крови осуществлялся в вакуумные пробирки (вакутейнеры) объемом 6 мл, содержащие K₂ЭДТА в качестве антикоагулянта.

В каждую вакуумную пробирку отбиралось 6 мл крови, пробирки перемешивались, через 30 минут центрифугировались при охлаждении. Плазму из супернатанта переносили в две предварительно промаркированные криопробирки [аналитическая (А) и архивная аликвоты (В)], объем аналитической аликвоты составлял не менее 1,5 мл. После переноса плазмы в криопробирки её незамедлительно замораживали на сухом льду. В дальнейшем образцы хранились при температуре ≤ -20 °С. Индивидуальные комплекты хранились в разных морозильных камерах. Таким образом, до отправки все образцы хранились в клиническом центре в морозильной камере с контролируемой температурой ≤ -20 °С.

Анализ концентрации телмисартана был выполнен в 23 образцах плазмы крови, взятых у всех добровольцев в течение четырех периодов исследования в следующих временных точках: 0 (до приёма препарата), через 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 12,0; 16,0; 24,0; 48,0 и 72,0 ч.

Анализ концентрации амлодипина был произведен в 19 образцах плазмы крови, взятых во временные точки: 0 (до приёма препарата), через 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 12,0; 16,0; 24,0; 48,0 и 72,0 ч в течение четырех периодов исследования. Анализ данных проб проводился только у первой группы добровольцев (30 человек, а не все 58), так как этого было достаточно для достижения необходимой мощности исследования. Подробности приведены в разделе «Результаты и обсуждение».

Анализ концентрации действующих веществ в образцах

Для определения концентраций телмисартана в 5380 образцах, полученных в клинической части исследования, была использована ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами [6, 7]. В качестве внутреннего стандарта использовался изотопномеченный (дейтерированный) телмисартан. Аналитическая серия включала 112 образцов: 1 холостой образец; 1 холостой образец с добавлением внутреннего стандарта; 9 калибровочных образцов; 6 образцов контроля качества; 92 (23 × 4) образца от одного добровольца из четырех периодов. Аналитическая методика предполагала использование 100 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики составил 2,0–1200,0 нг/мл телмисартана в плазме, для расчёта концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Подготовка проб осуществлялась методом депротенинизации (осаждения белков). Полученные депротенинизаты были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС-системе TSQ Quantum Discovery MAX.

Для определения концентраций амлодипина в 2280 образцах, полученных в клинической части исследования, также была использована отдельная ВЭЖХ-МС/МС методика, валидированная в соответствии с руководствами [6, 7]. В качестве внутреннего стандарта использовался изотопно-меченный (дейтерированный) амлодипин. Аналитическая серия включала 95 образцов: 1 холостой образец; 1 холостой образец с добавлением внутреннего стандарта; 9 калибровочных образцов; 6 образцов контроля качества; 76 (19 × 4) образцов от одного добровольца из четырех периодов, а также 3 дополнительных бланковых образца. Аналитическая методика предполагала использование 500 мкл образца для каждого анализа. Аналитический диапазон методики составил 0,1–15,0 нг/мл амлодипина в плазме, для расчёта концентраций использовалась взвешенная линейная регрессия. Подготовка проб осуществлялась методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Полученные экстракты были проанализированы на ВЭЖХ-МС/МС-системе Shimadzu 8050.

Персонал, участвующий в выполнении биоаналитического анализа, не был проинформирован о схеме рандомизации и не обладал информацией о последовательности приема исследуемого препарата и препарата сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Участники исследования и безопасность

С момента подписания информированных согласий до окончания наблюдения за добровольцами было выявлено 39 нежелательных явлений у 18 добровольцев. Все зарегистрированные нежелательные явления (НЯ) были несерьезными.

Соотношение частоты развития нежелательных явлений составило: 16 НЯ после приема исследуемого препарата; 21 НЯ после приема референсного препарата; 2 НЯ не были связаны с приемами препаратов, так как они возникли перед приемом препарата в 1 периоде.

После применения исследуемого препарата вероятная связь НЯ с приемом препарата прослеживалась в 1 случае (головокружение), после приема препарата сравнения в 3 случаях (гипотония). В 14 случаях возникновения НЯ (гипотония, головокружение, головная боль) после приема исследуемого препарата и в 17 (гипотония, головокружение, головная боль, обморок) после приема препарата сравнения связь НЯ с препаратом оценивалась как возможная. В 2 случаях возникновения НЯ (тошнота, головная боль) связь с препаратом была установлена как сомнительная. В 2 случаях связь с приемом препарата была оценена как неклассифицируемая (головокружение, гипотония), так как НЯ произошло до приема препарата исследования.

Во всех случаях исходом НЯ являлось выздоровление. Степень тяжести во всех случаях оценена как легкая.

Фармакокинетические параметры и оценка биоэквивалентности

Фармакокинетические параметры телмисартана

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы – площади под фармакокинетической кривой, AUC_{0-72} – для исследуемого и референсного препаратов ($M \pm SD$) составили $2249,8 \pm 1594,2$ нг · ч/мл (диапазон от 101,6 до 7622,1 нг · ч/мл) и $2289,5 \pm 1588,8$ нг · ч/мл (диапазон от 106,4 до 7948,7 нг · ч/мл) соответственно.

Средние значения максимальных концентраций телмисартана (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев при приеме исследуемого препарата, ($M \pm SD$) составили $435,6 \pm 500,0$ нг/мл (диапазон от 26,7 до 3446,0 нг/мл), для референсного – $475,7 \pm 459,7$ нг/мл (диапазон от 68,3 до 3086,4 нг/мл) (таблица 1, рисунок 1).

Медианы времени достижения максимальной концентрации (T_{max}) для исследуемого и референсного препаратов были равны 1,25 ч и 1,00 ч соответственно.

Таблица 1. Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров телмисартана (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 1. Summary average pharmacokinetic parameters of telmisartan (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (Т) Test formulation (T)		Референсный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, % T/R ratio, %
		Среднее Average	CV, %	Среднее Average	CV, %	
C_{max} , нг/мл C_{max} , ng/ml	116	435,6	114,80	475,7	96,63	97,20
t_{max} , ч t_{max} , h	116	1,40	49,99	1,22	63,76	142,26
AUC_{0-72} , нг · ч/мл AUC_{0-72} , ng · h/ml	116	2249,8	70,86	2289,5	69,40	99,99
λ_z , ч ⁻¹ λ_z , h ⁻¹	116	0,04093	73,68	0,04148	76,49	122,75
$t_{1/2}$, ч $t_{1/2}$, h	116	23,74	62,43	23,83	69,76	138,07

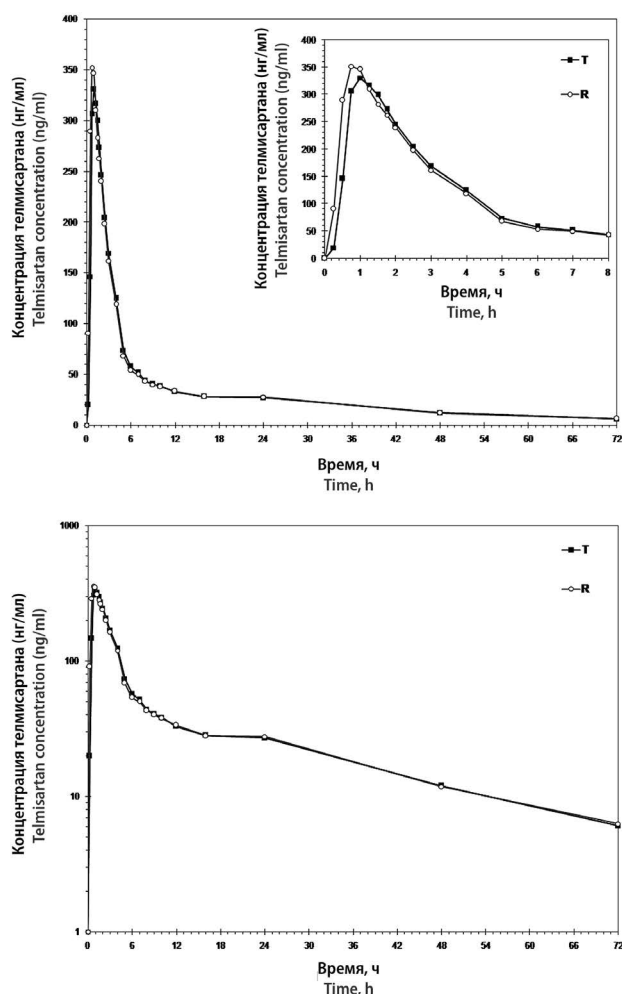


Рисунок 1. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили телмисартана в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного исследуемого препарата Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) в сравнении с приёмом монокомпонентного референсного препарата Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмбХ, Германия), Т – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референсный)

Figure 1. Average pharmacokinetic profiles of telmisartan in blood plasma after a single administration under fasting of Telzap® AM (telmisartan + amlodipine, tablets, 80 + 10 mg, Zentiva ks company, Czech Republic) and Mikardis® (telmisartan, tablets 80 mg, Beringer Ingelheim International GmbH, Germany), T – test formulation, R – reference formulation

но. Средние значения данного показателя ($M \pm SD$) составили $1,40 \pm 0,70$ ч и $1,22 \pm 0,78$ ч для исследуемого и референсного препаратов соответственно. Различия между препаратами по параметру T_{max} являются статистически значимыми ($p < 0,05$, медианный тест, тест Краскела – Уоллиса). Для исследуемого и референсного препаратов получены следующие значения показателей: $T_{1/2}$ $23,74 \pm 14,82$ ч и $23,83 \pm 16,63$ ч соответственно; λ_z $0,04093 \pm 0,03016$ ч⁻¹ и $0,04148 \pm 0,03173$ ч⁻¹ соответственно.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-72}(T)/$

$AUC_{0-72}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референсному, составило 99,99 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T)/C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 97,20 %.

Фармакокинетические параметры амлодипина

Средние значения основного параметра, характеризующего биодоступность действующего вещества из лекарственной формы – площади под фармакокинетической кривой, AUC_{0-72} – для исследуемого и референсного препаратов ($M \pm SD$) составили $206,694 \pm 53,665$ нг · ч/мл (диапазон от 126,267 до 314,326 нг · ч/мл) и $216,520 \pm 59,892$ нг · ч/мл (диапазон от 118,971 до 325,627 нг · ч/мл) соответственно.

Средние значения максимальных концентраций амлодипина (C_{max}), определяемых в плазме крови добровольцев при приёме исследуемого препарата, ($M \pm SD$) составили $5,375 \pm 1,312$ нг/мл (диапазон от 3,685 до 8,340 нг/мл), для референсного – $5,724 \pm 1,478$ нг/мл (диапазон от 3,295 до 8,660 нг/мл) (таблица 2, рисунок 2).

Медианы времени достижения максимальной концентрации для исследуемого и референсного препаратов совпали и были равны 7,00 ч. Средние значения данного показателя ($M \pm SD$) составили $7,51 \pm 1,87$ ч и $7,18 \pm 1,73$ ч для исследуемого и референсного препаратов соответственно. Различия между препаратами по параметру T_{max} являются статистически незначимыми ($p > 0,05$, медианный тест, тест Краскела – Уоллиса). Для исследуемого и референсного препаратов получены следующие значения показателей: $T_{1/2}$ $40,22 \pm 10,38$ ч и $39,28 \pm 8,26$ ч соответственно; λ_z $0,01817 \pm 0,00383$ ч⁻¹ и $0,01830 \pm 0,00330$ ч⁻¹ соответственно.

Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $AUC_{0-72}(T)/AUC_{0-72}(R)$, характеризующего относительную биодоступность исследуемого препарата по отношению к референсному, составило 96,73 %. Среднее арифметическое значение отношения фармакокинетических параметров $C_{max}(T)/C_{max}(R)$, характеризующего относительную степень всасывания активного вещества, составило 95,18 %.

Оценка биоэквивалентности

Биоэквивалентность исследуемого и референсного препаратов оценивали на основании 90%-го ДИ ln-преобразованных значений AUC_{0-72} и C_{max} телмисартана и амлодипина как основных параметров. Согласно протоколу, препараты считались биоэквивалентными, если границы оцененного ДИ для AUC_{0-72} и C_{max} находились в пределах 80,00–125,00 % (при подтверждении, что вариабельность C_{max} телмисартана референсного препарата составляет более 30 %, границы 90%-ых ДИ для данного фармакокинетичес-

Таблица 2. Сводные данные средних арифметических значений фармакокинетических параметров амлодипина (N – число измерений, CV – коэффициент вариации)

Table 2. Summary average pharmacokinetic parameters of amlodipine (N – number of observations, CV – coefficient of variation)

Параметр Parameter	N	Исследуемый препарат (Т) Test formulation (T)		Референсный препарат (R) Reference formulation (R)		Отношение T/R, % T/R ratio, %
		Среднее Average	CV, %	Среднее Average	CV, %	
C_{max} нг/мл C_{max} ng/ml	60	5,375	24,40	5,724	25,83	95,18
t_{max} ч t_{max} h	60	7,51	24,87	7,18	24,17	109,49
AUC_{0-72} нг · ч/мл AUC_{0-72} ng · h/ml	60	206,694	25,96	216,520	27,66	96,73
λ_z ч ⁻¹ λ_z h ⁻¹	60	0,01817	21,10	0,01830	18,00	100,08
$t_{1/2}$ ч $t_{1/2}$ h	60	40,22	25,81	39,28	21,03	102,90

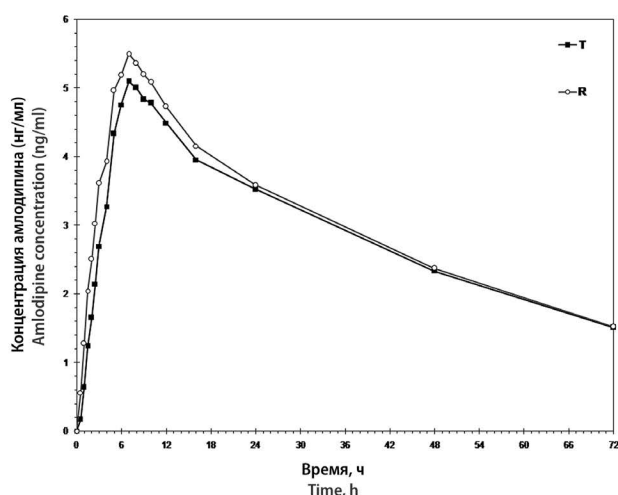
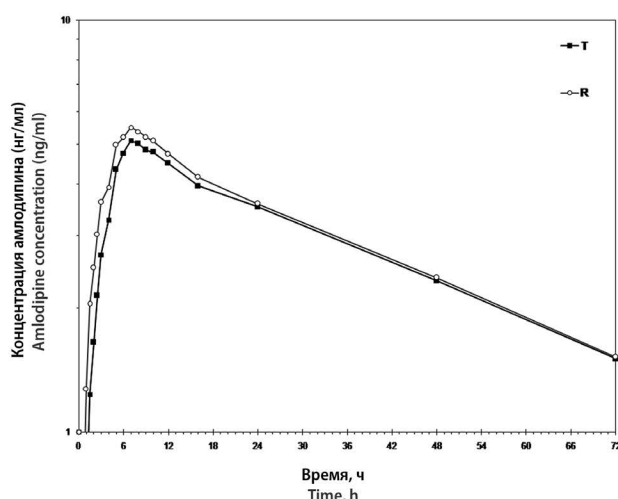


Рисунок 2. Усреднённые (среднее по препарату) фармакокинетические профили амлодипина в плазме крови добровольцев после однократного приёма комбинированного исследуемого препарата Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) в сравнении с приёмом монокомпонентного референсного препарата Норваск® [амлодипин, таблетки 10 мг, Пфайзер Эйч.Си.Пи. Корпорэйшн (США), Россия], Т – исследуемый (тестируемый) препарат, R – препарат сравнения (референсный).

Figure 2. Average pharmacokinetic profiles of amlodipine in blood plasma after a single administration under fasting of Telzap® AM (telmisartan + amlodipine, tablets, 80 + 10 mg, Zentiva KS company, Czech Republic) and Norvask® [amlodipine, tablets 10 mg, Pfizer HCP Corporation (USA), Russia], T – test formulation, R – reference formulation



C_{max} (R) (f'') составила 86,62 %, 90%-ый ДИ для логарифмически преобразованных данных: 79,70–4,13 %, что находится в рамках допустимого расширенного диапазона (76,73–130,32 %). Диапазон был расширен на основании полученных в исследовании данных о высокой внутрисубъектной вариабельности параметра C_{max} для референсного лекарственного препарата: значение CV_{intra} для него составило 35,93 % (более 30 %), в соответствии с этой величиной рассчитан допустимый расширенный диапазон ДИ. Данный подход описан Руководством по экспертизе лекарственных средств, том 1 [6], руководством ЕАЭС [7]. Отметим, что авторы других опубликованных исследований биоэквивалентности также нередко сталкивались с необходимостью расширения ДИ для телмисартана [8–11].

Амлодипин же, напротив, согласно литературным данным [12–14], относится к маловариабельным с точки зрения фармакокинетики препаратам. Этим объясняется тот факт, что в исследовании биоэквивалентности по амлодипину принимали участие лишь 30 добровольцев, а не все 58. Необходимости проводить анализ его концентраций у всех добровольцев не возникло, поскольку для достижения заданной статистической мощности исследования было достаточно 30 добровольцев.

кого параметра могли быть увеличены в соответствии с протоколом).

Для телмисартана точечная оценка индивидуальных отношений AUC_{0-72} (T)/ AUC_{0-72} (R) (f') составила 97,40 %, 90%-ый ДИ для логарифмически преобразованных данных: 93,45–101,51%, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Точечная оценка индивидуальных отношений C_{max} (T)/

Для амлодипина точечная оценка индивидуальных отношений $AUC_{0-72}(T)/AUC_{0-72}(R)$ (f') составила 95,96 %, 90%-ый ДИ для логарифмически преобразованных данных: 93,43–98,56 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %). Точечная оценка индивидуальных отношений $C_{max}(T)/C_{max}(R)$ (f'') составила 94,31 %, 90%-ый ДИ для логарифмически преобразованных данных: 91,28–97,44 %, что находится в рамках допустимого диапазона (80,00–125,00 %) (таблица 3).

Результаты исследования биоэквивалентности послужили основанием для регистрации препарата Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) под номером ЛП-005472.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках регистрации комбинированного препарата Телзап® АМ было проведено исследование его биоэквивалентности относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® и Норваск® при однократном приеме здоровыми добровольцами натошак. На основании полученных данных можно констатировать, что исследуемые препараты характеризуются высокой степенью сходства показателей фармакокинетики. Индивидуальные и усредненные профили фармакокинетических кривых исследуемого и референсного препаратов как телмисартана, так и амлодипина имеют совпадающие формы. Исследуемые препараты характеризуются близкими значениями относительной биодоступности телмисартана и амлодипина, а также максимальной концентрацией телмисартана и амлодипина. ДИ для

отношений средних геометрических значений оцениваемых показателей телмисартана и амлодипина исследуемого и референсного препаратов полностью соответствуют установленным пределам.

Таким образом, выполненное исследование позволяет констатировать биоэквивалентность двухкомпонентного препарата Телзап® АМ (телмисартан + амлодипин, таблетки 80 + 10 мг, Зентива к.с., Чешская Республика) относительно совместно принимаемых монокомпонентных препаратов Микардис® (телмисартан, таблетки 80 мг, Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмБХ, Германия) и Норваск® [амлодипин, таблетки 10 мг, Пфайзер Эйч.Си.Пи. Корпорэйшн (США), Россия].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ettehad D, Emdin C. A., Kiran A., Anderson S. G., Callender M. B., Emberson J., Chalmers J., Rodgers A., Rahimi K. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387(10022):957–967.
2. Neutel J. M. The role of combination therapy in the management of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):1469–1473.
3. Gupta A. K., Arshad S., Poulter N. R. Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis. *Hypertension*. 2010;55(2):399–407.
4. Шехян Г. Г., Ялымов А. А., Щикота А. М., Задионченко В. С., Варенцов С. И. Комбинация телмисартана и амлодипина в лечении артериальной гипертензии. *Системные гипертензии*. 2014;11(1):64–72.
5. Ушкалова Е. А., Зырянов С. К., Ушкалова А. В. Воспроизведенные лекарственные средства и особенности их регулирования. *Неврология, Нейропсихиатрия, Психосоматика*. 2016;8(3):82–87.
6. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К., 2013. 280 с.
7. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств Евразийского экономического союза. 2016.
8. Zhang P., Zhang Y., Chen X., Li R., Yin J., Zhong D. Pharmacokinetics of telmisartan in healthy Chinese subjects after oral administration of two dosage levels. *Arzneimittelforschung*. 2006.56(8):569–573.

Таблица 3. ДИ для отношений фармакокинетических параметров C_{max} и $AUC_{(0-72)}$ (N – число измерений, CV – коэффициент вариации, T – исследуемый препарат, R – препарат сравнения)

Table 3. CI for C_{max} and $AUC_{(0-72)}$ ratios (N – number of observations, CV – coefficient of variation, T – test formulation, R – reference formulation)

Параметр Parameter	Средние геометрические Geometric mean				Отношение T/R, % T/R ratio, %	90 % ДИ, % 90 % CI, %		БЭ BE	CV, %
	N	T	N	R		Нижний Lower	Верхний Upper		
Телмисартан Telmisartan									
AUC ₍₀₋₇₂₎ (нг · ч/мл) AUC ₀₋₇₂ ng · h/ml	116	1724,1	116	1771,2	97,40	93,45	101,51	ДА ¹ Yes ¹	19,20
C _{max} (нг/мл) C _{max} ng/ml	116	295,6	116	342,2	86,62	79,70	94,13	ДА ² Yes ²	39,75
Амлодипин Amlodipine									
AUC ₍₀₋₇₂₎ (нг · ч/мл) AUC ₀₋₇₂ ng · h/ml	60	199,828	60	208,239	95,96	93,43	98,56	ДА ¹ Yes ¹	8,81
C _{max} (нг/мл) C _{max} ng/ml	60	5,220	60	5,535	94,31	91,28	97,44	ДА ¹ Yes ¹	10,78

Примечание. ¹ Границы ДИ: 80,00–125,00 %.

² Границы ДИ: 76,73–130,32 %, так как CV_{intra} для референсного препарата составило 35,93 %.

Note. ¹ CI range: 80,00–125,00 %.

² CI range: 76,73–130,32 %, because CV_{intra} of reference formulation is 35,93 %.

9. Kang W. Y., Seong S. J., Ohk B., Gwon M., Kim B. K., La S., Kim H., Cho S., Yoon Y., Yang H., Lee H. W. Pharmacokinetic and bioequivalence study of a telmisartan/S-amlodipine fixed-dose combination (CKD-828) formulation and coadministered telmisartan and S-amlodipine in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;12:545–553.
10. Paramanindita A. S., Harahap Y., Prasaja B., Wijayanti T. R., Lusthom W., Sofiah R. E., Sandra M., Trisari Y. A Bioequivalence Study of Two Telmisartan 80 mg Tablets in Healthy Indonesian Subjects: An Open Label, Three-way, Three-period, Partial Replicate Crossover Study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2020:1–25.
11. EMA/576613/2010 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) assessment report on telmisartan/amlodipine. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/twynsta-epar-public-assessment-report_en.pdf.
12. Meredith P. A., Elliott H. L. Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clinical pharmacokinetics*. 1992;22(1):22–31.
13. Abernethy D. R. The pharmacokinetic profile of amlodipine. *American heart journal*. 1989;118(5):1100–1103.
14. Kaynak M. S., Bogacz A., Stelmasinski M., Sahin S. Bioavailability File: Amlodipine. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;36(4):207–222.
4. Shehyan G. G., Yalymov A. A., Schikota A. M., Zadionchenko V. S., Varentsov S. I. The telmisartan and amlodipine combination in the treatment of hypertension. *Sistemnaja gipertonija = System hypertension*. 2014;11(1):64–72. (In Russ).
5. Ushkalova E. A., Zyryanov S. K., Ushkalova A. V. Generics and the specific features of their regulation. *Nevrologiya, Neuropsychiatriya, Psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2016;8(3):82–87. (In Russ).
6. Mironov A. N. Guidelines for the examination of medicines. T. I. Moscow: *Grif and K.*, 2013. 280 p. (In Russ).
7. Rules for conducting bioequivalence studies of drug products on the territory of EAEU. 2016. (In Russ).
8. Zhang P., Zhang Y., Chen X., Li R., Yin J., Zhong D. Pharmacokinetics of telmisartan in healthy Chinese subjects after oral administration of two dosage levels. *Arzneimittelforschung*. 2006.56(8):569–573.
9. Kang W. Y., Seong S. J., Ohk B., Gwon M., Kim B. K., La S., Kim H., Cho S., Yoon Y., Yang H., Lee H. W. Pharmacokinetic and bioequivalence study of a telmisartan/S-amlodipine fixed-dose combination (CKD-828) formulation and coadministered telmisartan and S-amlodipine in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;12:545–553.
10. Paramanindita A. S., Harahap Y., Prasaja B., Wijayanti T. R., Lusthom W., Sofiah R. E., Sandra M., Trisari Y. A Bioequivalence Study of Two Telmisartan 80 mg Tablets in Healthy Indonesian Subjects: An Open Label, Three-way, Three-period, Partial Replicate Crossover Study. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2020:1–25.
11. EMA/576613/2010 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) assessment report on telmisartan/amlodipine. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/twynsta-epar-public-assessment-report_en.pdf.
12. Meredith P. A., Elliott H. L. Clinical pharmacokinetics of amlodipine. *Clinical pharmacokinetics*. 1992;22(1):22–31.
13. Abernethy D. R. The pharmacokinetic profile of amlodipine. *American heart journal*. 1989;118(5):1100–1103.
14. Kaynak M. S., Bogacz A., Stelmasinski M., Sahin S. Bioavailability File: Amlodipine. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;36(4):207–222.
1. Ettehad D, Emdin C. A., Kiran A., Anderson S. G., Callender M. B., Emberson J., Chalmers J., Rodgers A., Rahimi K. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2016;387(10022):957–967.
2. Neutel J. M. The role of combination therapy in the management of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):1469–1473.
3. Gupta A. K., Arshad S., Poulter N. R. Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis. *Hypertension*. 2010;55(2):399–407.

REFERENCES

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-164-170>
УДК 615.01; 658.562



Обзорная статья/Review article

Обязанности держателей регистрационных удостоверений в части соблюдения правил GMP (обзор)

А. П. Мешковский¹, Н. В. Пятигорская¹, Ж. И. Аладышева¹, В. В. Береговых¹,
А. М. Пятигорский¹, Н. С. Николенко^{1*}, М. М. Маршалова¹, В. В. Беляев¹

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

*Контактное лицо: Николенко Наталья Сергеевна. E-mail: ivashechckova@yandex.ru

ORCID: А. П. Мешковский – <http://orcid.org/0000-0002-6016-3237>; Н. В. Пятигорская – <http://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; Ж. И. Аладышева – <http://orcid.org/0000-0002-2441-3542>; В. В. Береговых – <http://orcid.org/0000-0002-0210-4570>; А. М. Пятигорский – <https://orcid.org/0000-0001-6671-5832>; Н. С. Николенко – <http://orcid.org/0000-0001-5567-8570>; М. М. Маршалова – <https://orcid.org/0000-0002-5281-7771>; В. В. Беляев – <http://orcid.org/0000-0002-3011-9390>.

Статья поступила: 21.07.2020. Статья принята в печать: 29.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. В статье рассматривается проблема разделения обязанностей и ответственности между держателями регистрационных удостоверений (ДРУ) и держателями лицензий на производство (производителями) в сфере обеспечения качества лекарственных средств. Необходимость разделять функции и сферы ответственности, касающиеся производителей и ДРУ, возникает в ситуации работы по контрактам или в соответствии с соглашениями по качеству.

Текст. В руководствах фармацевтического сектора Евросоюза (ЕС) указания относительно обязанностей ДРУ в отношении правил GMP разбросаны по различным главам Руководства по GMP и приложениям к нему. Кроме того, отдельные положения по данной теме содержатся в директивах ЕС. С учётом этого в январе 2020 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕМА) выпустило проект документа «Соображения о правилах GMP и держателях регистрационных удостоверений». Цель проекта – объединить многочисленные указания на этот счёт и в ряде случаев снабдить их пояснениями практического характера. Важнейшие обязанности ДРУ в этой части касаются содействия соблюдению правил GMP путём установления двухстороннего обмена информацией между национальными регуляторными органами, руководством производственных площадок, уполномоченными лицами, осуществляющими выпуск продукции в оборот, и другими заинтересованными сторонами. В рамках этой функции ДРУ предоставляет информацию регуляторным органам и производственным площадкам, как правило, через уполномоченных лиц, а также собирает и обобщает данные о качестве продукции, полученные из разных источников в сфере производства и в цепочке распределения.

Заключение. В отношении правил GMP ЕАЭС можно сделать вывод, что на фоне активного обновления европейских отраслевых требований отставание ряда разделов этого документа становится всё более очевидным. Представляется необходимым активизировать работу по текущему пересмотру правил GMP ЕАЭС. В отношении специфических функций ДРУ, связанных с обеспечением качества фармацевтической продукции, предлагается на базе опубликованного проекта методического документа Евросоюза подготовить разъяснения на эту тему, которые дополняли бы правила GMP ЕАЭС.

Ключевые слова: надлежащая производственная практика, правила GMP, лекарственные средства, фармацевтическая промышленность.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы в равной степени принимали участие в подборе и анализе материалов, обсуждении результатов и написании текста статьи. А. П. Мешковский, Н. В. Пятигорская, Ж. И. Аладышева и В. В. Береговых осуществили написание текста рукописи.

Для цитирования: Мешковский А. П., Пятигорская Н. В., Аладышева Ж. И., Береговых В. В., Пятигорский А. М., Николенко Н. С., Маршалова М. М., Беляев В. В. Обязанности держателей регистрационных удостоверений в части соблюдения правил GMP. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-164-170>

Responsibilities of the Marketing Authorisation Holders in Respect of GMP Compliance (Review)

Andrei P. Meshkovskiy¹, Natalia V. Pyatigorskaya¹, Zhanna I. Aladysheva¹, Valery V. Beregovykh¹,
Alexander M. Pyatigorskiy¹, Natalia S. Nikolenko^{1*}, Marina M. Marshalova¹, Vasily V. Belyaev¹

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

*Corresponding author: Natalia S. Nikolenko. E-mail: ivashechckova@yandex.ru

ORCID: Andrei P. Meshkovskiy – <http://orcid.org/0000-0002-6016-3237>; Natalia V. Pyatigorskaya – <http://orcid.org/0000-0003-4901-4625>; Zhanna I. Aladysheva – <http://orcid.org/0000-0002-2441-3542>; Valery V. Beregovykh – <http://orcid.org/0000-0002-0210-4570>; Alexander M. Pyatigorskiy – <https://orcid.org/0000-0001-6671-5832>; Natalia S. Nikolenko – <http://orcid.org/0000-0001-5567-8570>; Marina M. Marshalova – <https://orcid.org/0000-0002-5281-7771>; Vasily V. Belyaev – <http://orcid.org/0000-0002-3011-9390>.

Received: 21.07.2020. Revised: 29.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. The article is focused on differences in quality assurance-related obligations and responsibilities between Marketing Authorisation Holders (MAHs) and manufacturing authorisation holder (manufacturers) in pharmaceutical industry. In case of outsourcing and technical agreements there is a need to differentiate responsibilities related to quality assurance between the above mentioned categories.

Text. The guidelines for the pharmaceutical sector of the European Union (EU) provide guidance on the responsibilities of the MAHs in relation to the GMP rules, which are scattered throughout the various chapters of the GMP and its appendices. In addition, certain provisions on this topic are contained in the EU directives. With this in mind the European Medicines Agency (EMA) issued in January 2020 a draft Reflection paper on Good

manufacturing practice and Marketing Authorisation Holders. The draft clarifies that while certain activities of an MAH may be delegated to the manufacturer, MAH retains ultimate responsibility for the performance of a medicinal product, its safety, quality and efficacy. The important obligation of MAH in this context is to facilitate GMP compliance by establishing a robust two-way communication system with national competent authorities, manufacturing sites, Qualified Persons (QPs) certifying batches before release, and other interested parties. The MAH ought to communicate to manufacturing personnel, normally through QPs, production processes and related quality control procedures, including subsequent variations, described in registration dossiers.

Conclusion. A general one conclusion: in view of rapid developments in the EU GMP Guide, the Eurasian Economic Union GMP requirements ought to be updated. In respect of specific responsibilities of MAH pertaining to GMP compliance the EMA draft Reflection paper merits attention as a guidance regarding separation of obligations and responsibilities between MAH and personnel of manufacturing sights.

Keywords: good manufacturing practice, GMP rules, medicines, drug industry.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors equally participated in the selection and analysis of materials, discussion of the results and writing the text. Andrei P. Meshkovskiy, Natalia V. Pyatigorskaya, Zhanna I. Aladysheva and Valery V. Beregovykh – writing the text of the article.

For citation: Meshkovskiy A. P., Pyatigorskaya N. V., Aladysheva Zh. I., Beregovykh V. V., Pyatigorskii A. M., Nikolenko N. S., Marshalova M. M., Belyaev V. V. Responsibilities of the marketing authorisation holders in respect of GMP compliance. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-164-170>

ВВЕДЕНИЕ

Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 19 марта 2019 г. № 10 «Об актуализированном Информационном справочнике понятий, применяемых в рамках Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» дает определение «держателю регистрационного удостоверения» (ДРУ), в соответствии с которым – это юридическое лицо, на имя которого выдано регистрационное удостоверение на лекарственный препарат и которое несет ответственность за безопасность, эффективность и качество лекарственного препарата.

В фармацевтической отрасли Евросоюза (ЕС) отмечается тенденция разделения ответственности между держателями регистрационных удостоверений (ДРУ) и держателями лицензий на производство (производителями) в сфере обеспечения качества лекарственных средств.

В соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» держатель или владелец регистрационного удостоверения лекарственного препарата – это разработчик лекарственного средства, производитель лекарственных средств или иное юридическое лицо, обладающее правом владения регистрационным удостоверением, которые несут ответственность за качество, эффективность и безопасность лекарственного препарата [1].

В Руководстве по надлежащей производственной практике Евросоюза [2], в главе 1 в разделе «Принцип», выделена ответственность держателя лицензии на производство лекарственных средств (производителя) и уполномоченных лиц за функционирование фармацевтической системы качества. Упоминаний о держателях регистрационных удостоверений (ДРУ) в этом

разделе Руководства нет. Аналогичная ситуация и в Правилах GMP ЕАЭС [3]. Вместе с тем в фармацевтической отрасли Евросоюза отмечается тенденция разделения ответственности между ДРУ и производителями в сфере обеспечения качества продукции.

Следует уточнить, что в Евросоюзе в соответствующих случаях используется термин «лицензия на производство и импорт» (Marketing and Importation Authorisation – MIA). Это связано с тем, что выпускающий анализ образцов и сертификация серий уполномоченным лицом считаются этапами производства. В соответствии с союзным законодательством эти операции в отношении импортируемых лекарственных препаратов осуществляются после перемещения их через таможенную границу. Таким образом, процедура импорта оказывается встроенной в производственный процесс и рассматривается как его часть.

В этой связи следует обратить внимание на формулировку пересмотренного в 2015 г. Приложения № 16 к Руководству по GMP Евросоюза о роли и функциях уполномоченных лиц. В разделе 2 «Принцип», п. 2.1 указано, что в конечном итоге ответственность за функциональные *характеристики* лекарственного препарата в течение его жизненного цикла: его безопасность, эффективность и качество лежит на ДРУ. Персонал производственной площадки, в первую очередь уполномоченное лицо, отвечает за выпуск однородной продукции, каждая серия которой полностью соответствует правилам GMP и всем положениям регистрационного досье в части свойств и условий производства. Опубликованный в марте 2020 г. проект нового приложения № 21 к Руководству по GMP ЕС «Импорт лекарственных препаратов» подтверждает это положение: «для препаратов, разрешённых в Евросоюзе общую ответственность за размещение на рынке несёт держатель регистрационного удостоверения (ДРУ)» [4].

Необходимость различать функции и сферы ответственности, касающиеся производителей и ДРУ возникает в ситуации работы по контрактам или наличия соглашений по качеству. Важнейшие обязанности ДРУ в этой части касаются содействия соблюдению правил GMP путём установления двухстороннего обмена информацией между национальными регуляторными органами, производственными площадками, уполномоченными лицами и другими заинтересованными сторонами. В рамках этой функции ДРУ предоставляет информацию регуляторным органам и производственным площадкам, как правило, через уполномоченных лиц, а также собирает и обобщает данные о качестве продукции, полученные из разных источников в сфере производства и в цепочке распределения.

Деятельность ДРУ в этой сфере заслуживает рассмотрения в связи с её ролью в системе качества предприятия, в частности, в непрерывном совершенствовании условий производства. Указания на этот счёт были введены в Главу 1 правил GMP ЕС в 2013 г. в связи с их пересмотром в целях концептуальной и терминологической увязки с трёхсторонним руководством ICH Q10 по фармацевтической системе качества (ФСК) [5]. Согласно этому документу ФСК, соответствующая производству лекарственных препаратов, должна обеспечивать содействие непрерывному совершенствованию путём внедрения улучшений в сфере качества, отвечающих текущему уровню знаний о продуктах и процессах. Это положение имеет прямое отношение к ДРУ. Ниже рассматривается обязанность ДРУ в части оценки результатов обзора качества продукции и принятия вытекающих из этого мер. Её исполнение позволяет получить знания о процессах производства активных фармацевтических субстанций (АФС) и готовых лекарственных препаратов, о соответствующих видах контроля. Важно также умение обращаться с такими документами, как досье производства АФИ, сертификаты соответствия фармакопее и др.

Подобные знания дают возможность ДРУ инициировать совместно с партнёрами по производственной площадке требуемые действия по непрерывному улучшению. Эти же данные способствуют выявлению необходимых улучшений собственных действий ДРУ, относящихся к регуляторным функциям. Примером может служить управление изменениями в заявках на регистрацию в отношении Модуля 3 Общего технического документа (ОТД). Как полагают специалисты, в перспективе важность надёжного процесса коммуникации между регуляторами и площадками через посредство ДРУ будет возрастать в связи с внедрением гибких механизмов согласования пост-регистрационных изменений условий производства. Использование гибких подходов в той сфере, основанных на фармацевтической системе качества предприятия, предусмотрено новым международным Руководством ICH Q12 [6].

В руководствах фармацевтического сектора Евросоюза указания относительно обязанностей ДРУ в отношении правил GMP разбросаны по различным главам Руководства по GMP и приложениям к нему. Кроме того, отдельные положения по данной теме содержатся в директивах ЕС. С учётом этого в январе 2020 г. Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) выпустило проект документа под заголовком «Соображения о правилах GMP и держателях регистрационных удостоверений» [7]. Цель проекта – объединить многочисленные указания на этот счёт и в ряде случаев снабдить их пояснениями практического характера. Ожидается, что документ в окончательном виде будет принят в текущем году.

Как известно, в ЕАЭС Правила GMP и порядок регистрации новых лекарственных препаратов приближены к требованиям Евросоюза. В России и её ближнем зарубежье получили широкое распространение работы по контрактам и техническим соглашениям, что отражает мировые тенденции. Однако требования правил GMP по традиции адресуются чаще всего производителем. В Правилах GMP ЕАЭС, как показано ниже, встречаются замечания о роли ДРУ, однако они разрознены и, в ряде случаев, недостаточно конкретны.

В связи с перспективами интеграции фармацевтической отрасли России в мировую экономику и вступления инспектората в PIC/S очевидна необходимость перехода к толкованию и применению правил GMP, приближенному к международной практике. С учётом изложенного представляется, что содержащиеся в настоящей статье разъяснения о роли ДРУ актуальны для работников фармацевтической отрасли России и других стран Евразийского Экономического Союза.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Для удобства рассмотрения функций ДРУ, связанных с соблюдением правил GMP, разделим эти функции на два основных направления: обязательства перед регуляторными органами и действия, связанные с аутсорсингом и техническими соглашениями.

ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПЕРЕД РЕГУЛЯТОРНЫМИ ОРГАНАМИ

Опыт европейских фармкомпаний показывает, что обязательства перед регуляторными органами, не находящиеся в надлежащей степени под контролем ДРУ, могут сыграть негативную роль при оценке соответствия препаратов условиям их регистрации.

Во вступлении к Руководству по GMP Евросоюза указано, что от производителя ожидается систематическое внедрение требований регистрационных удостоверений (включая материалы заявки), относящихся к безопасности, эффективности и качеству, в организацию производства, контроля качества и выпуска продукции в оборот. Согласно главе 4 «Доку-

ментация», документы должны соответствовать относящимся к делу разделам регистрационных досье (или досье спецификаций на исследуемый препарат). Положения о соблюдении требований регистрационных досье содержатся также в Правилах GMP ЕАЭС, в частности в первом предложении главы 1 «Фармацевтическая система качества».

В этой связи следует уточнить понятие «регистрационное досье». В реальной жизни редки случаи регистрации препарата без замечаний к материалам заявки. Как правило, в процессе рассмотрения досье возникают вопросы к заявителю и (или) требования дополнений, внесения изменений т. п. В связи с этим необходимо различать исходное досье, т. е. пакет документов, поданный вместе с заявкой, и окончательную версию досье, включающую все поправки и дополнения, внесённые заявителем в ходе рассмотрения заявки. Положения правил GMP о соответствии условий производства материалам заявки на регистрацию касаются лишь окончательных версий досье.

Поскольку за содержание досье отвечает ДРУ, именно в его обязанности входит доведение до производственных площадок содержания регистрационных материалов, относящихся к их деятельности. Особую важность в этом плане имеют разделы, касающиеся технологии и внутрипроизводственного контроля, спецификаций для выпуска и хранения, текста и дизайна маркировки и сопровождающей препарат информации. В странах Евросоюза в этих целях практикуется составление сокращённых версий Модулей 1 и 3 Общего технического документа (ОТД) соответствующих заявок для использования персоналом площадок, чаще всего уполномоченными лицами. В дальнейшем эти данные должны находиться в системе контроля изменений.

Обязательства в части заявки на регистрацию препаратов

Обязательства перед регуляторными органами начинаются уже на этапе подготовки заявки на регистрацию препарата. Заявитель, иначе спонсор, должен убедиться в том, что все включаемые в досье производители имеют действующие сертификаты GMP или аналогичные документы. После одобрения заявки спонсор получает статус ДРУ. В дальнейшем в течение жизненного цикла препарата ДРУ обязан следить за наличием у производителей разрешительных документов, подтверждающих соблюдение правил GMP.

В Евросоюзе статья 46 Директивы 2001/83/ЕС возлагает на производителя обязанность использовать в работе только АФС, произведенные в соответствии с правилами GMP и находившиеся в цепочке распределения, отвечающей правилам GDP для фармацевтических субстанций. В соответствии со статьёй 8(3)(ha) той же Директивы заявитель должен представить информацию о соблюдении правил GMP производителем АФС, которая будет использоваться в производстве готовой лекарственной формы.

С этой целью в заявку необходимо включить письменное подтверждение (декларацию уполномоченного лица) того, что производитель готового лекарственного препарата проверил соблюдение правил GMP производителем АФС путём аудитов. Использование аналогичных подходов предусмотрено Правилами регистрации и экспертизы лекарственных средств Евразийского экономического союза, Приложение № 1, п. 1.6.7 [8].

Это означает, что заявитель (будущий ДРУ) обязан убедиться в соблюдении правил GMP производителем АФС до подачи заявки на регистрацию. Обязанность подтверждать GMP-статус производителя исходных субстанций сохраняется и в пострегистрационный период, однако теперь она возлагается на ДРУ. Подтверждение должно таким же образом основываться на аудитах, проводимых регулярно, обычно с периодичностью в 3 года. Отчёты об аудитах должны быть легко доступны для предъявления регуляторам по их требованию.

Важной обязанностью ДРУ является доведение до производственных площадок информации относительно одобренных изменений в регистрационном досье с указанием сроков введения изменений. Эта обязанность вытекает из содержания раздела 7.6 главы 7, в частности из следующего положения: «Заказчик должен предоставить подрядчику всю информацию и данные, необходимые для правильного выполнения передаваемых по контракту операций в соответствии с действующими регуляторными требованиями и регистрационное удостоверение на соответствующий препарат». Соответствующее требование включено в Правила GMP ЕАЭС (п. 7.6) [3].

Уведомление уполномоченных органов о дефектах качества

В главе 8 Руководства по GMP ЕС отражены обязанности производителя уведомлять уполномоченные органы о дефектах качества, могущих привести к отзывам. В соответствии с формулировкой статьи в редакции 2014 г., в случаях производства по контракту ДРУ должен быть вовлечён в этот процесс уведомления. Данное положение распространяется также на препараты, могущие оказаться фальсифицированными. Из этого следует, что ДРУ должен располагать системой сбора и анализа сообщений о дефектах качества и случаях подозреваемой фальсификации препаратов. В соответствующем разделе Правил GMP ЕАЭС отмечена роль «владельца регистрационного удостоверения».

Уведомление уполномоченных органов об ограничениях поставок

В соответствии с главой 5 Руководства по GMP ЕС производитель должен информировать ДРУ о затруднениях в технологических операциях, могущих привести к существенным ограничениям поставок.

Соблюдение этого требования облегчает последнему выполнение его обязательств, касающихся уведомления уполномоченных органов о планируемых сокращениях поставок препарата, об ограничениях поставок или прекращении его выпуска, отзыва с рынка, требования аннулировать регистрационное удостоверение или намерения не ходатайствовать о продлении срока действия РУ на данный препарат. Основанием для этого требования являются положения статьи 123 Директивы 2001/83/ЕС. Соответствующее требование включено и в Правила GMP ЕАЭС (п. 5.71) [3].

АУТСОРСИНГ И ТЕХНИЧЕСКИЕ СОГЛАШЕНИЯ

В Руководстве по GMP Евросоюза неоднократно отмечается важность наличия технических соглашений между ДРУ и производителем готового препарата. Наряду с этим рекомендуется заключение соглашений между ДРУ и производителем АФС в целях уточнения требований в части обмена информацией, касающейся досье на активные субстанции или сертификатов пригодности Европейской фармакопеи. В главе 7 Руководства, касающейся действий по аутсорсингу, указано (раздел 7.3): «в случаях, когда ДРУ и производитель – разные лица, должны быть приняты организационные меры в соответствии с принципами, изложенными в настоящей статье». Аналогичное положение имеется в Правилах GMP ЕАЭС (п. 7.3).

Технические соглашения в производстве биологических препаратов

В разделе 36(g) Приложения 2 к Руководству по GMP ЕС в случае использования человеческих тканей и клеток в качестве исходных материалов предусмотрена ответственность ДРУ за наличие технического соглашения между сторонами (производителями, организациями по взятию тканей, спонсорами), определяющего задачи каждой стороны, включая ответственных и уполномоченных лиц. В Правилах GMP ЕАЭС этому положению соответствует п. 36 g) Приложения 2 (Требования к производству биологических (в том числе иммунобиологических) активных фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов для медицинского применения).

Технические соглашения в отношении использования ионизирующего излучения в производстве лекарственных препаратов

Ответственность ДРУ в этой сфере отражена в Приложении 12 к Руководству по ЕС. Прежде всего ДРУ вместе с производителем отвечает за согласование проекта режима облучения. В разделе 33 Приложения 12 «Использование ионизирующего излучения в производстве лекарственных препаратов» (п. 40 (33) в Приказе № 916) указано: «Если требуемая доза из-

лучения получается более, чем за один проход через радиационную камеру, это должно быть согласовано с ДРУ. ДРУ должно быть уведомлено о незапланированных перерывах во время облучения. Это положение требует от ДРУ специальных технических знаний о проекте цикла облучения. Специалисты европейских компаний не считают возможным делегирование данной ответственности производителю. В Правилах GMP ЕАЭС указано лишь, что требуемая доза должна быть указана в регистрационном досье.

В Приложении 12 к европейским, также как и к евразийским правилам GMP отмечено, что место и метод хранения документации по каждому циклу облучения должны быть согласованы между организацией, проводившей облучение, и ДРУ (разделы 44 и 45 соответственно). Считается, что эта задача может быть передана производителю в рамках соглашения по аутсорсингу.

Соглашения в части хранения контрольных и архивных образцов

Порядок хранения контрольных и архивных образцов изложен в Приложении 19 к Руководству по GMP ЕС и в Правилах GMP ЕАЭС. В разделе 6 указано на необходимость иметь письменное соглашение между сторонами в случаях, когда ДРУ не является лицом, ответственным за выпуск серий продукции. В соглашении должна быть определена обязанность по отбору и хранению контрольных и архивных образцов. В случае прекращения производства производитель должен заключить договор о передаче отобранных ранее образцов другому производителю или иному лицу. ДРУ должен согласовать с регуляторным органом достаточность мер по хранению контрольных и архивных образцов.

При этом важно учитывать, что, хотя отбор и хранение контрольных образцов обычно рассматривается как чисто производственная деятельность, из приведенных выше положений вытекает, что ответственность за заключение соглашений лежит на ДРУ.

Сохранение документации

В правилах GMP содержатся определённые требования в части сохранения документации, поддерживающие заявки на регистрацию препаратов, и касающиеся таким образом роли ДРУ. Хотя действия по сохранению документации могут быть переданы по аутсорсингу производителю, считается, что ответственность сохраняется за ДРУ. В главе 4 (раздел 4.12) Руководства по GMP ЕС, равно как и Правил GMP ЕАЭС, указано, что критическая документация, поддерживающая включённые в заявку данные, например, относящаяся к валидации или испытаниям стабильности, должна сохраняться в период действия регистрационных удостоверений. Формально это положение обращено к производителю. Важно, однако, чтобы ДРУ

проконтролировал наличие на производстве политики и практики сохранения документации. Считается, что этот момент должен быть отражён в любых договорах по аутсорсингу, в технических соглашениях или контрактах между сторонами.

Обзоры качества продукции

Обязанность ДРУ в части оценки результатов обзора качества продукции и принятия вытекающих из этого мер установлена в главе 1 Руководства по GMP ЕС в следующей формулировке: «производитель и ДРУ, если это разные лица, должны оценивать результаты обзора и определять необходимость выполнения САРА или действий по ревалидации в рамках ФСК». В Правилах GMP ЕАЭС этому соответствует п. 1.11. Это означает, что в случае передачи производственных функций по аутсорсингу ответственность за различные разделы ФСК может быть поделена между производителем и ДРУ. Такое разделение должно быть отражено в договоре об аутсорсинге или оформлено в виде технического соглашения в отношении обзоров по качеству.

Считается признанным, что обзоры качества продукции готовятся в основном производителем, а не ДРУ. Действительно, большая часть входящей в них информации относится к сфере GMP и находится на производственных площадках. Однако некоторые разделы этой информации могут попадать к ДРУ, минуя производителя. Соответственно, обязанностью ДРУ будет обеспечить включение этих данных в обзор с тем, чтобы они были должным образом учтены в процессе его анализа. Примером являются данные о стабильности препаратов. ДРУ может передать третьей стороне, например сторонней контрольно-аналитической лаборатории, работу по хранению и анализу образцов по программе текущего испытания стабильности. В этом случае результаты испытаний поступят к ДРУ. Другие примеры: претензии с рынка, отзывы продукции, некоторые изменения к регистрационному досье. Информация по этим разделам обзоров качества может находиться как на площадке, так и у ДРУ. С учётом изложенного не рекомендуется полностью делегировать производителю функции ДРУ по оценке результатов обзоров качества продукции. Практика показывает, что недостаточное участие ДРУ в этой работе приводит к риску выпуска серий, не отвечающих в полной мере предъявляемым требованиям.

Обязанности в сфере управления дефектами качества, претензиями и отзывами продукции

В главе 8 Руководства по GMP ЕС, раздел 8.4 указано, что функции и ответственность производителя, спонсора исследуемого препарата, ДРУ и иных участников оценки, принятия решений или распростране-

ния информации, а также действий по снижению рисков, связанных с недоброкачественной продукцией, должны быть документированы. В соответствующем разделе Правил GMP ЕАЭС нет упоминаний о роли ДРУ.

В случаях аутсорсинга эта документация должна содержаться в контракте в соответствии с положениями главы 7. Во многих компаниях, располагающих несколькими производственными площадками, управление дефектами качества и претензиями централизовано. Однако такая структура не должна замедлять расследований и управления дефектами качества. Считается, что соблюдение этого требования входит в обязанности ДРУ. Важно также отметить, что заявитель на регистрацию препарата, а в дальнейшем ДРУ должен назначить лицо, ответственное за управление дефектами продукции и отзывами в пострегистрационный период с указанием этого лица в заявке на регистрацию. В фармацевтическом секторе ЕС требования на этот счёт содержатся в различных нормативах (указания для заявителей на регистрацию препаратов, Регламент 726/2004, Приложение I к Директиве 2001/83/ЕС с последующими поправками).

ДЕЛЕГИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЙ ДРУ

В мировой практике некоторые действия ДРУ могут быть делегированы производителю или иным лицам. В ситуации, когда ДРУ и производитель находятся в составе одной группы компаний, разграничение функций между ними может быть отражено в инструкциях, стандартных процедурах (СОП) или иных внутренних документах. В случае нахождения ДРУ и производителя в различных, не связанных между собой компаниях обязанности сторон должны быть чётко изложены в контрактах или приложенных к ним технических соглашениях. Следует, однако, учитывать, что правила GMP не допускают сокращения ответственности ДРУ за действия, передаваемые другим сторонам. В обеих указанных выше ситуациях ответственность ДРУ за эти действия одинакова.

Любое поручение функций ДРУ производителю или иным лицам должно быть изложено в письменном виде и согласовано заинтересованными сторонами. При этом ДРУ несет ответственность за обеспечение того, что сторона, которой действия передаются, обладает в должной мере компетенцией, информацией и знаниями, необходимыми для успешного выполнения передаваемых действий (Руководство ЕС по GMP и Правила GMP ЕАЭС, глава 7, разделы 7.5 и 7.6).

Особого внимания требуют ситуации, в которых задачи передаются частями, т. е. более, чем одной стороне. В этих случаях надзор за действиями различных участников производственного процесса в течение всего жизненного цикла препарата является наиболее сложным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можно сделать некоторые выводы в отношении Правил GMP ЕАЭС. Общий вывод сводится к тому, что на фоне активного обновления европейских отраслевых требований отставание ряда разделов этого документа становится всё более очевидным. Представляется необходимым активизировать работу по текущему пересмотру Правил GMP ЕАЭС. В отношении специфических функций ДРУ, связанных с обеспечением качества фармацевтической продукции, предлагается на базе опубликованного проекта методического документа Евросоюза подготовить разъяснения на эту тему, которые дополняли бы правила GMP ЕАЭС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. EUROPEAN COMMISSION. Brussels. Available at: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en.
3. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 13.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Доступно по: http://fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-GMP.pdf.
4. EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 21: Importation of medicinal products. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/importation_medicinalproducts_draftannex21_en.pdf.
5. Pharmaceutical Quality System ICH Q10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Current Step 4 version dated 4 June 2008. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q10_Guideline.pdf.
6. Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management. ICH Q12. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Final version Adopted on 20 November 2019. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf.
7. Reflection paper on Good Manufacturing Practice and Marketing Authorisation Holders. Draft. European Medicines Agency. EMA/457570/2019, 14 January 2020. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf.
8. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/456026097>.

REFERENCES

1. Federal Law of 12.04.2010 No. 61 «On drug circulation». (In Russ).
2. Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. EUROPEAN COMMISSION. Brussels. Available at: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en.
3. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission dated 13.11.2016 No. 77 «On approval Of the rules of good manufacturing practice of the Eurasian economic Union». Available at: http://fptl.ru/biblioteka/eaunion_lekarstva/EAEU_pravila-GMP.pdf. (In Russ).

4. EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 21: Importation of medicinal products. Available at: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/importation_medicinalproducts_draftannex21_en.pdf.
5. Pharmaceutical Quality System ICH Q10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Current Step 4 version dated 4 June 2008. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q10_Guideline.pdf.
6. Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management. ICH Q12. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Final version Adopted on 20 November 2019. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf.
7. Reflection paper on Good Manufacturing Practice and Marketing Authorisation Holders. Draft. European Medicines Agency. EMA/457570/2019, 14 January 2020. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf.
8. Decision of the Council of the Eurasian economic Commission dated 03.11.2016 No. 78 «On the Rules for registration and examination of medicinal products for medical use». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026097>.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179>
УДК 615.31:661



Оригинальная статья/Research article

Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств

А. Е. Феофилова¹, А. В. Фотеева¹, Н. Б. Ростова^{2*}

1 – ООО «Парма Клиникал», 614113, Россия, Пермский край, г. Пермь, Причальная улица, здание 16

2 – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

*Контактное лицо: Ростова Наталья Борисовна. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: А. Е. Феофилова – <https://orcid.org/0000-0002-4958-2078>; А. В. Фотеева – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; Н. Б. Ростова – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Статья поступила: 30.04.2020. Статья принята в печать: 30.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. На этапе перехода от национального регулирования сферы обращения лекарственных средств к единому в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) гармонизация требований фармацевтической разработки определяет необходимость использования современных подходов, включающих применение новых методик и инструментов, гарантируя выход на рынки ЕАЭС и других интеграционных объединений эффективных и безопасных лекарственных препаратов. Новая модель разработки лекарственных средств, описанная в руководствах ICH (The International Conference of Harmonization), предусматривает применение научно-ориентированного подхода к разработке с использованием соответствующих инструментов, таких как определение целевого профиля лекарственного средства, установление критических показателей качества, оценка рисков, установление пространства проектных параметров, разработка стратегии контроля, управление жизненным циклом лекарственного препарата (ЛП) и постоянное улучшение существующих процессов. Данные подходы и методики не относятся к элементам традиционной концепции фармацевтической разработки и, хотя являются в большинстве малоизученными и затратными, однако гарантируют выход эффективного лекарственного препарата с заданными показателями качества. **Цель.** Рассмотреть преимущества и необходимость использования новой модели разработки воспроизведенного лекарственного препарата в современных условиях.

Материалы и методы. В качестве материалов исследования выступали доступные источники литературы, нормативные документы и руководства по фармацевтической разработке лекарственных препаратов, документы регистрационного досье, отчеты регуляторных органов по экспертизе лекарственных средств, отчеты разработчика по фармацевтической разработке. Достижение поставленных целей в работе осуществлялось на основе общенаучных методов исследования в рамках сравнительного и логического анализа, анализа и интерпретации полученных данных о фармацевтической разработке.

Результаты и обсуждения. Исходя из представленных данных, очевидно, что парадигма качества путем разработки Quality by Design является улучшенным, современным инструментом для разработки лекарственных препаратов с заданными параметрами качества.

Заключение. Современная концепция качества путем разработки требует применения новых дорогостоящих методов, знаний и навыков персонала, вложения инвестиций и временных затрат, однако она результативно ориентирована на получение эффективного лекарственного препарата с заданным профилем качества.

Ключевые слова: ICH, Quality by Design, качество путем разработки, традиционная разработка, улучшенный подход, оценка рисков.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторами проведен анализ данных по разработке лекарственных препаратов, интерпретированы результаты, полученные при разработке воспроизведенных лекарственных препаратов, сделаны выводы о преимуществах и необходимости применения современного метода фармацевтической разработки Quality by Design.

Для цитирования: Феофилова А. Е., Фотеева А. В., Ростова Н. Б. Современные концепции фармацевтической разработки в условиях перехода к единому регулированию сферы обращения лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179>

The Modern Concepts of Pharmaceutical Development in the Context of the Transition to a Uniform Regulation of Medicinal Products Circulation

Anna E. Feofilova¹, Alexandra V. Foteeva¹, Natalya B. Rostova^{2*}

1 – LLC «Parma Clinical», 1B, Prichalnaya str., Perm, 614113, Russia

2 – Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

*Corresponding author: Natalya B. Rostova. E-mail: n-rostova@mail.ru

ORCID: Anna E. Feofilova – <https://orcid.org/0000-0002-4958-2078>; Alexandra V. Foteeva – <https://orcid.org/0000-0002-3752-7848>; Natalya B. Rostova – <http://orcid.org/0000-0001-5579-394X>.

Received: 30.04.2020. Revised: 30.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. At the stage of transition from national to a uniform of circulation of pharmaceutical products regulation at the Eurasian Economic Union (EAEU) framework, harmonization of requirements for the development of medicines determines the need of use modern approaches, including the use of new methods and tools, thus to assure EAEU and other integration associations markets entry for effective and safe medicinal

© Феофилова А. Е., Фотеева А. В., Ростова Н. Б., 2020

© Feofilova A. E., Foteeva A. V., Rostova N. B., 2020

products. The new medicinal products development model, described in the ICH guidelines (The International Conference of Harmonization), involves a science-based approach to developing, using appropriate tools, such as defining a target product profile, establishing of critical quality indicators, risk assessment, establishment of design space, development of control strategy, drug lifecycle management and continuous improvement of existing processes. These approaches and techniques are not a part of the traditional paradigm of pharmaceutical development; although they are poorly understood and expensive, they ensure the market entry of effective products with the desired quality parameters.

Aim. Main purposes of this work are to compare two concepts of pharmaceutical development of medicinal products: traditional and improved, and to consider the necessity of new model using in generic products development.

Materials and methods. Research materials of this study were available literature sources, regulatory documents and guidelines regarding pharmaceutical products development, registration dossier documents, reports of regulatory authorities, pharmaceutical development reports. The achieving of study purposes was carried out on the basis of scientific research methods in the framework of comparative and logical analysis, and through the analysis and interpretation of the obtained data regarding pharmaceutical development of medicinal products.

Results and discussion. On the basis of the data provided, author assess that modern concept it is a new, improved tool for development of medicinal products with specified quality parameters.

Conclusion. The modern paradigm requires new expensive methods, stuff special knowledge and skills, investment and time, but it is effectively oriented on development of effective and safe medicinal products.

Keywords: ICH (The International Conference of Harmonization), Quality by Design, traditional development, improved approach, risk assessment.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors analyzed data regarding development of medicinal products, interpreted results obtained in the development of generic products, and concluded advantages and necessity of using the modern method of pharmaceutical development – Quality by Design.

For citation: Feofilova A. E., Foteeva A. V., Rostova N. B. The modern concepts of pharmaceutical development in the context of the transition to a uniform regulation of medicinal products circulation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-171-179>

ВВЕДЕНИЕ

В условиях перехода от национального регулирования к единому в рамках Союза (ЕАЭС), процесса гармонизации руководящих документов в фармацевтической области и нацеленности на обеспечение потребителя лекарственными средствами (ЛС) высокого качества организации-разработчики воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП) обязаны гарантировать, что произведенный ЛП обладает заданными свойствами, не уступает по характеристикам эффективности и безопасности эталонному (референтному) ЛП и соответствует ожиданиям как медицинского сообщества, так и пациентов.

В связи с этим отечественные разработчики ЛС широко используют в своей работе нормативные документы международных интеграционных объединений. Например, широкое распространение получили такие руководства, как ICH Q7, ICH Q8, ICH Q9 [1].

Руководство ICH Q8 предполагает использование в разработке воспроизведенных ЛП концепции качества путем разработки (Quality by Design, QbD). Принцип QbD предусматривает системный подход к разработке, основанный на получении надежных научных данных и управлении рисками для качества. При таком подходе разработку начинают с предварительного определения целей и уделяют особое внимание пониманию продукции и процесса, а также его контролю.

Центральными в подходе QbD являются экспериментальные исследования. При этом стратегия включает фазы скрининга, определения параметров (количественной оценки эффектов переменных и их взаимодействия друг с другом) и оптимизации (в т. ч. изучения устойчивости). Важнейшее значение приобретает аналитическое сопровождение экспериментов

и оценка аналитических методик, необходимых для контроля процесса и продукции. При подходе QbD элементы фармацевтической разработки включают:

- определение целевого профиля качества препарата;
- установление критических показателей качества;
- общую оценку рисков, выражающуюся во взаимосвязи характеристик материалов и параметров процесса с критическими показателями качества ЛП;
- установление пространства проектных параметров;
- разработку стратегии контроля;
- управление жизненным циклом ЛП и постоянное улучшение, под которым понимается повышение способности выполнять требования [2–4].

Характеристики продукта и процесса, важные для планируемой эффективности, должны быть получены из комбинации предварительных знаний и экспериментальной оценки в ходе разработки продукта, что необходимо для достижения целей качества путем разработки (Quality by Design). Критические свойства веществ и технологические параметры связаны с критическими качественными характеристиками продукта. Изменчивость в рамках процесса снижается благодаря пониманию свойств продукта и процесса, и все это приводит к повышению качества готового ЛП, снижению рисков и повышению эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе были использованы доступные источники литературы, нормативные документы и руководства по фармацевтической разработке лекарственных препаратов, документы регистрационного досье, отчеты регуляторных органов по экспертизе лекарственных средств, отчеты разработчика по фармацевтической разработке.

Для более полного понимания преимуществ современной концепции стоит рассмотреть два подхода к фармацевтической разработке: традиционный и улучшенный – качество путем разработки, используя общенаучные методы исследования сравнительного и логического анализа данных о фармацевтической разработке лекарственных средств (таблица 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Как видно из таблицы 1, безусловно, новая концепция Quality by Design предполагает применение большого количества различных практик и подходов, возможно, еще и не освоенных группой разработчиков ЛС, требующих временных затрат, определенной квалификации и опыта сотрудников, соответствующей материальной и научной базы.

Однако преимущества концепции качество путем разработки очевидны:

1. Разработка ЛС через парадигму Quality by Design является эффективным средством для достижения лучшего понимания параметров процесса и составов, разрабатываемых на платформе данного вида разработки, а так же их оптимизации.
2. Исследование физико-химических характеристик и совместимости ЛС с другими веществами, акцент на критических и технологических свойствах процесса в совокупности представляет собой надежный способ получения ранее запланированной лекарственной формы с заданными показателями качества.
3. Определение пространства для разработки и факторы риска для всех возможных процессов позволяет определить критические уровни.
4. Пространство разработки в сочетании с системой управления рисками обеспечивают гибкие подходы с возможностью постоянного совершенствования, что впоследствии приводит разработчика ЛП к производству продукта с заданными показателями качества, а также к обеспечению пациентов ЛП приемлемого качества.
5. Использование подхода к управлению рисками приводит к выявлению критических качественных признаков, лучшему пониманию процессов, далее разрабатываются способы уменьшения рисков, предлагается стратегия контроля, соизмеримая с уровнем (приоритетом) риска.

Итак, предложенная руководством ICH Q8 конструкция «Качество» путем разработки становится необходимым и своевременным инструментом в современной фармацевтической промышленности. QbD является систематическим подходом к фармацевтической разработке, который начинается с определения объектов и продукта, понимания процессов, а также процесса контроля. Это означает проектирование и разработку составов и производственного процесса, гарантируя предопределение объектов качества ЛП [5–8].

Каковы преимущества концепции «Качество» путем разработки на практике? Отечественным разработчиком воспроизведенных ЛП осуществлялась

фармацевтическая разработка ЛП с применением традиционного подхода. Использовался однофакторный эксперимент, изменяющимся параметром, было изменение вспомогательного вещества и далее – его количества. Разработчики ориентировались на целевой профиль качества зарегистрированного в РФ оригинального ЛП, а именно это совпадение лекарственной формы, количества действующего вещества, пути введения, предполагаемых показаний к применению.

В рамках процесса разработки использовалась одномерная комбинация входных переменных, были изучены критические свойства действующего и вспомогательных веществ, определены критические параметры процесса производства, параметры контроля в процессе производства, свойства, влияющие на эффективность ЛП (был изучен параметр «Растворение»). Была спланирована стратегия контроля: контроль тестированием промежуточных и конечных параметров продукта. Спецификация конечного продукта была основана на данных опытных серий, доступных на момент формирования регистрационного досье. В рамках процесса фармацевтической разработки ЛП так же было изучено влияние первичных упаковочных материалов на готовую лекарственную форму. Лекарственный препарат выдержал долгосрочные испытания стабильности в условиях $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и $60 \pm 5\%$ в течение 12 месяцев. Показатели оценки качества разрабатываемого ЛП соответствовали показателям качества спецификации оригинального ЛП. Однако данный ЛП не прошел процедуру государственной регистрации, обеспечивающую доступ на фармацевтический рынок. При экспертизе качества готового ЛП в процессе его государственной регистрации разработчиком был получен отказ от регуляторного органа.

Причиной отказа при регистрации явилось включение в спецификацию конечного продукта показателя «Растворение», несмотря на то, что данный показатель удовлетворял требованиям спецификации оригинального ЛП. Однако для разрабатываемого воспроизведенного ЛП включение данного показателя с учетом применяемых методик, явилось ошибочным. Разработчиками данного ЛП не были в полной мере изучены свойства действующего лекарственного вещества, характеристики которых определяли включение в спецификацию показателя «Распадаемость» вместо показателя «Растворение». Использование концепции традиционного подхода не позволило разработчику ЛП предотвратить возникновение данной ошибки.

Такого несоответствия, вероятно, было бы возможным избежать при использовании улучшенного подхода (Quality by Design) к разработке, который включает в себя такие этапы как оценка рисков для качества ЛС на этапе определения критических свойств веществ, применение мер по минимизации и устранению рисков. Для исключения подобных ошибок в рамках концепции Quality by Design так же предусматривается использование научного подхода к изучению свойств веществ и планированию процессов контроля.

Таблица 1. Основные преимущества концепции QbD по отношению к традиционной фармацевтической разработке

№ п/п № p/p	Аспект Aspect	Традиционный подход Traditional approach	Улучшенный подход Quality by Design Improved approach Quality by Design	Пример Example	Преимущества современной концепции (QbD) Advantages of a modern concept (QbD)
1	Фармацевтическая разработка	Эмпирический подход. Исследования по разработке часто проводятся с одной переменной	Многофакторные эксперименты для понимания продукта и процесса. Понимание свойств продукта и процесса. Применение инструментов PAT (Process Analytical Technology – процессно-аналитическая технология) [5]	На основе полученных ранее знаний и экспериментальных данных строится многомерная модель, связывающая требуемые свойства продукта и процесса	Процесс включает в себя идентификацию производственных и научных принципов, влияющих на качество ЛП. Подход необходим для уменьшения времени циклов, предотвращения отказов со стороны регуляторного органа и потерь в процессе разработки и дальнейшего производства, выхода продукта в реальном времени. Способствует генерированию процессов для разработки качественных ЛС. Дает ценную информацию о матрице составов, не включая важные для разработки детали, помогает в процессе контроля и оптимизации, в улучшении эффективности процессов The process involves identifying the production and scientific principles that effect on quality of MP. This approach is necessary to reduce the cycle time, prevent failures by the regulatory and losses during development and further production, as well as real-time product output. Contributes to the generation of processes for the development of high-quality medicines. It provides valuable information about the matrix of compositions, without excluding important details for the developer, helps in the process of control and optimization, and in improving the efficiency of the processes.
1.1	Определение целевого профиля лекарственного препарата Determination of the target product profile	Суммирует клинические объекты лекарственной формы Summarizes clinical objects of the dosage form		Лекарственная форма: капсулы/таблетки. Сила действия. Путь введения: внутрь. Предполагаемые показания к применению Dosage form: capsules/tablets. Strenght. Route of administration: inside. Intended indications for use	Формирует основу дизайна для разработки Forms the basis of the development design

№ п/п № p/p	Аспект Aspect	Традиционный подход Traditional approach	Улучшенный подход Quality by Design Improved approach Quality by Design	Пример Example	Преимущества современной концепции (QbD) Advantages of a modern concept (QbD)
1.1.1	Определение целевого профиля качества препарата	Составы производятся на соответствие испытаниям контроля качества, прописанным в спецификации продукта	Сочетание характеристик или свойств, относящихся к качеству продукта, которые в идеале должны быть достигнуты и гарантируют эффективность и безопасность ЛП. Является перспективным, т. к. описывает цели для разработчика и динamico развивающимся, т. к. может обновляться и пересматриваться на разных этапах разработки при поступлении новой информации по данному процессу A combination of characteristics or properties related to the quality of the product that should ideally be achieved and guarantee the effectiveness and safety of the drug. It is promising, because it describes the goals for the developer and it is developing, because it can be updated and revised at different stages of development when new information about this process is received.	Целевой профиль качества переводит целевой профиль ЛП в количественные испытания, например количественное определение, примеси, растворение, биоэквивалентность, стабильность и т.д.	Формирует основу дизайна для разработки
1.2	Создание пространства разработки	В основном используется одномерная комбинация входных переменных	Определяется как многомерная комбинация входных переменных (например, свойств материалов) и параметров процесса, которые гарантируют качество разрабатываемого ЛП It is defined as a multidimensional combination of input variables (for example, material properties) and process parameters that guarantee the quality of the developed MP	Перемещение за пределы данного пространства рассматривается как изменение и обычно инициирует процесс изменения документации после утверждения Moving outside of this space is considered a change and usually initiates the documentation modification process after approval	Понимание характеристик действующего вещества и других компонентов ЛП невозможно без создания пространства разработки Understanding the characteristics of active substance and other components of the drug is impossible without creating a development space
1.3	Дизайн эксперимента	Дизайн эксперимента	Метод для определения взаимодействия между факторами, влияющими на процесс и результатом данного процесса A method for determining the interaction between factors that affect a process and the process result	Можно использовать для сравнительных экспериментов, отсеивающих экспериментов, моделирования поверхности отклика и регрессионного моделирования It can be used for comparison experiments, screening experiments, response surface modeling, and regression modeling	Сравнительные эксперименты используются для выбора лучшей из двух альтернатив Comparative experiments are used to select better of two alternatives

№ п/п № p/p	Аспект Aspect	Традиционный подход Traditional approach	Улучшенный подход Quality by Design Improved approach Quality by Design	Пример Example	Преимущества современной концепции (QbD) Advantages of a modern concept (QbD)
1.4	Критические свойства веществ Critical properties of substances	Критические свойства веществ изучаются на уровне, заложенном в регуляторных требованиях, внутренних документах разработчика-производителя ЛС Critical properties of substances are studied at the level laid down in the regulatory requirements, internal documents of the drug developer-manufacturer	Физические, химические, биологические или микробиологические свойства, или характеристики, которые должны быть в соответствующих пределах, диапазонах или соответствовать достижению требуемого качества ЛП Physical, chemical, biological, or microbiological properties or characteristics that must be within appropriate limits, ranges, or appropriately distributed to ensure that the required quality of the drug is achieved	Критические свойства в основном связаны с исходными материалами (действующие вещества и вспомогательные вещества), промежуточными продуктами и готовым продуктом Critical properties are mainly related to the raw materials (active substances and excipients), intermediate products, and the finished product	Неопределенная изменчивость исходных материалов может сказаться на качестве конечного продукта, если определенные свойства фармацевтических веществ не учтены в полной мере или не приняты во внимание в процессе производства The uncertain variability of raw materials can affect the quality of the final product if certain properties of pharmaceutical substances are not fully studied or taken into account in the production process
1.5	Критические параметры процесса Critical parameters of process		Критический параметр процесса – любой измеряемый входной параметр (исходные свойства или рабочий параметр) или выходной параметр (переменная состояния процесса или свойства на выходе) параметр процесса, который должен контролироваться для достижения желаемого качества продукта и последовательности процесса. Параметр является критическим, если изменение этого параметра может привести к тому, что ЛП не будет соответствовать своему целевому профилю (см. п. 1.1 таблицы) Critical process parameter – it is any measured input parameter (raw properties or operating parameter) or output parameter (process state variable or output properties) process parameter that must be monitored to achieve the desired product quality and process consistency. This parameter is critical, if changing this parameter may cause the MP to not match its target profile (see section 1.1 of the table)	Параметры процесса и свойства материалов, относящиеся к процессу влажного гранулирования, – свойства, связанные с лекарственным веществом: количество, форма, размер частиц, содержание влаги и насыпная плотность. Свойства, относящиеся к наполнителям: количество наполнителя, размер частиц наполнителя и плотность наполнителя. Рабочие параметры гранулирования: конфигурация измельчителя, скорость измельчения, время грануляции, температура, тип распылительной форсунки и скорость добавления связующего вещества. Свойства после процесса гранулирования: однородность смеси, распределение гранул по размерам, размер агломерата, влажность, насыпная плотность и т.д. Process parameters and material properties related to the wet granulation process – drug-related properties: quantity, shape, particle size, moisture content, and bulk density. Properties related to fillers: the amount of filler, the size of the filler particles, and the density of the filler. Granulation operating parameters: shredder configuration, grinding speed, granulation time, temperature, spray nozzle type, and binder addition rate. Properties after the granulation process: mixture uniformity, granule size distribution, agglomerate size, humidity, bulk density, etc.	Выявление вреда, тяжести его последствий и вероятности его возникновения для качества ГЛС Identification of harm, the severity of its consequences and the probability of its occurrence for the MP quality

№ п/п № p/p	Аспект Aspect	Традиционный подход Traditional approach	Улучшенный подход Quality by Design Improved approach Quality by Design	Пример Example	Преимущества современной концепции (QbD) Advantages of a modern concept (QbD)
1.6	Определение свойств, влияющих на эффективность ЛС Determination of properties that effect on effectiveness of drugs	Определяются Defined	Определяются Defined	Например, для ЛП в твердой лекарственной форме важно учитывать такие свойства как растворение/высвобождение ЛС, концентрация полимера, вязкость полимера или другие свойства, которые могут влиять на высвобождение препарата или его клиническую эффективность For example, for medicinal products in solid dosage form, it is important to take into account such properties as: dissolution/release of drugs, polymer concentration, polymer viscosity or other properties that may affect the release of the drug or its clinical effectiveness	Разработка препарата с заданной клинической эффективностью Development of medicinal product with a specific clinical effectiveness
1.7	Оценка Риска для Качества Quality Risk assessment	Практически отсутствует Practically absent	Ключевая цель оценки рисков при разработке ЛП заключается в определении степени влияния отдельных свойств материалов и параметров процесса на качество ЛП [6] The key goal of risk assessment in the development of MP is to determine the degree of influence of individual properties of materials and process parameters on the quality of MP [6]	Идентификация, анализ и оценка рисков для всех процессов жизненного цикла ЛП. Определение уровня риска, разработка плана минимизации и устранения рисков Identification, analysis and assessment of risks for all processes of the MP life cycle. Determining the level of risk, developing a plan to minimize and eliminate risks	Процесс необходим для реализации соответствующей стратегии контроля с целью обеспечения соответствия качества ЛП регуляторным и иным требованиям. Процесс необходим для понимания и прогнозирования источников изменений процессов. Оценка изменений осуществляется методом управления рисками качества The process is necessary to implement an appropriate control strategy in order to ensure that the quality of the medicinal product meets regulatory and other requirements. The process is necessary to understand and predict the sources of process variability. The assessment of changes is carried out by the quality risk management method
1.8	Стратегия контроля Control Strategy	Качество ЛП в основном контролируется промежуточными и конечными тестированиями продукта The quality of the product is mainly controlled by intermediate and final product testing	Качество продукта обеспечивается стратегией контроля, учитывающей риски. Стратегия, направленная на сокращение тестирований конечного продукта Product quality is ensured by a risk-based control strategy. The aim of the strategy is reducing testing of the final product	Стратегия контроля обычно включает в себя контроль исходных материалов, контроль и мониторинг технологических процессов. Готовые ЛП проверяются на качество путем оценки соответствия требованиям. Кроме того, производители, как правило, должны проводить обширные технологические испытания, такие как однородность смеси или твердость таблеток The control strategy usually includes control of raw materials, control and monitoring of technological processes. Finished products are checked for quality by assessing compliance with the requirements. Manufacturers usually have to conduct extensive technological tests, such as the uniformity of the mixture or the hardness of the tablets.	Стратегия контроля, включающая управление рисками позволяет гарантировать создание ЛП соответствующего качества The control strategy, which includes risk management, guarantees the creation of appropriate MP quality

Окончание таблицы 1

№ п/п № p/p	Аспект Aspect	Улучшенный подход Quality by Design Improved approach Quality by Design		Пример Example	Преимущества современной концепции (QbD) Advantages of a modern concept (QbD)
		Традиционный подход Traditional approach			
1.9	Спецификации продукта Product specification	Базируется на данных серий, доступных на момент регистрации Based on the series data available at the registration product time	Основана на желаемом действии продукта (заданном) с необходимой информацией Based on the desired product action with necessary information	Если продукт считается подходящим для коммерческих целей, тогда он должен соответствовать испытаниям контроля качества If the product is considered suitable for commercial purposes, then it should meet quality control tests	Возможность разработки препарата с заданными показателями качества The ability to develop a MP with the specified quality indicators
1.10	Управление жизненным циклом продукта Product lifecycle management	Присутствуют действия по исправлению и решению уже возникших проблем There are actions to fix and resolve problems that have been already occurred	Преимущественно предупреждающие действия. Непрерывное улучшение и совершенствование продукта Mainly preventive actions. Continuous improvement and improvement of the product	Знания, полученные в результате деятельности по передаче технологий, обеспечивают полезные исходные данные для производственного процесса, стратегии управления и валидации процессов, которые формируют основу для дальнейшего совершенствования продукции и процессов The knowledge gained from technology transfer activities provides useful inputs for the production process, management strategies, and process validation, which form the basis for further product and process improvement	В компании должна быть создана надежная система управления изменениями, которая должна быть способна контролировать, утверждать и внедрять изменения. Влияние всех изменений должно оцениваться с помощью этой системы, даже если изменение находится в пределах допустимых границ проектного пространства. Утвержденные изменения не должны оказывать какого-либо вредного влияния на качество продукции после ее внедрения The company should have a proper change management system that is able to monitor, approve, and implement changes. The impact of all changes should be evaluated using this system, even if the change is within the acceptable boundaries of the project space. The approved changes should not have any harmful effect on the quality of the product after its implementation

Несмотря на то, что современная концепция фармацевтической разработки ЛП требует более значительных финансовых ресурсов и временных затрат, а также включение новых научно-обоснованных подходов при разработке, результат, полученный исследователями, является запланированным и безошибочным, что и является важным аргументом для эффективной деятельности отечественных производителей [9–11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение улучшенной концепции при фармацевтической разработке воспроизведенных ЛП обеспечивает выход на рынок ЛП, не уступающих по всем показателям (качество, эффективность, безопасность) препаратам сравнения, повышает конкурентоспособность отечественных производителей ЛП, улучшает производственные процессы за счет значительного уменьшения ошибок планируемого серийного производства, открывает возможности выхода ЛП на рынок ЕАЭС и других международных интеграционных объединений, повышает уверенность регуляторного органа в качестве и воспроизводимости заданного качества ЛП и гарантирует своевременность получения разработчиком или держателем регистрационного удостоверения. В сложившейся ситуации перехода от национального к единому регулированию структура QbD становится обнадеживающим научным инструментом в обеспечении качества в области промышленной фармации.

Таким образом, улучшенный подход к фармацевтической разработке ЛС, сосредоточенный на тщательном понимании ЛП и процесса, с помощью которого он разрабатывается и производится наряду с управлением рисками, возникающими при разработке, может успешно применяться разработчиком и стать основой для создания гармонизированных регуляторных документов (руководств) в рамках ЕАЭС, направленных на создание ЛП с заданными показателями качества, удовлетворяющих существующим требованиям и являющимися эффективными и безопасными для пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q8 (R2) Pharmaceutical Development. 2009. Aug. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline. Accessed: 30 Aug 2009.
2. Food and Drug Administration. Guidance for industry, Q8(R1) Pharmaceutical Development. 2009. Nov. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073507>. Accessed: 4 Jan 2010.
3. ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q8 Pharmaceutical Development. 2005. Nov. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Concept_papers/Q10_Concept_Paper.pdf. Accessed: 05 Jan 2010.
4. ICH guideline Q9 on quality risk management, September 2015 EMA/CHMP/ICH/24235/2006 Committee for Human Medicinal Products. Available at: <https://www.ema.europa.eu/>
5. ICH. The International Conference of Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. 1999. Oct. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 10 Aug 2009.
6. ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Quality Risk Management Q.2005 Nov [Google Scholar].
7. OPS Process Analytical Technology – (PAT) Initiative. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 11 Aug 2009.
8. ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Pharmaceutical Quality System Q10. 2008 Jun [Google Scholar]. Available at: <https://www.ema.europa.eu/>
9. Власенко Ю. В. Проектно-ориентированный подход к разработке готовых лекарственных средств на примере дженерического многокомпонентного препарата, содержащего амоксицилин и клавулановую кислоту. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;1:30–36.
10. Голубев А. Н., Нгуен Т. Ш., Басевич А. В., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Марченко А. Л., Смирнова Е. М. Подходы к разработке состава таблеток с использованием современного статистического программного обеспечения и концепции Quality-by-Design. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(3):45–48. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
11. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ возможности применения принципа QbD к процессу разработки лекарственных средств на отечественных фармацевтических предприятиях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(4):20–26. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-20-26.

REFERENCES

1. ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q8 (R2) Pharmaceutical Development. 2009. Aug. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline. Accessed: 30 Aug 2009.
2. Food and Drug Administration. Guidance for industry, Q8(R1) Pharmaceutical Development. 2009. Nov. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm073507>. Accessed: 4 Jan 2010.
3. ICH. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q8 Pharmaceutical Development. 2005. Nov. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Concept_papers/Q10_Concept_Paper.pdf. Accessed: 05 Jan 2010.
4. ICH guideline Q9 on quality risk management, September 2015 EMA/CHMP/ICH/24235/2006 Committee for Human Medicinal Products. Available at: <https://www.ema.europa.eu/>
5. ICH. The International Conference of Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guideline Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. 1999. Oct. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 10 Aug 2009.
6. ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Quality Risk Management Q.2005 Nov [Google Scholar].
7. OPS Process Analytical Technology – (PAT) Initiative. Available at: <https://www.ema.europa.eu/> Accessed: 11 Aug 2009.
8. ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Pharmaceutical Quality System Q10. 2008 Jun [Google Scholar]. Available at: <https://www.ema.europa.eu/>
9. Vlasenko Yu. V. Project-oriented approach to finished pharma product development in the context of generic polycapomponent drug containing amoxycillin and clavulanic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;(1):30–36. (In Russ.).
10. Golubev A. N., Nguyen T. S., Basevich A. V., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Marchenko A. L., Smirnova E. M. Approaches to the Development of Drugs with the Use of Modern Statistical Software Concepts and Quality-by-Design. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(3):45–48. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-3-45-48.
11. Rozhnova S. A., Tsyapkina A. V. Comparative Analysis of the QbD Approach in the Pharmaceutical Industry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(4):20–26. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-4-20-26.

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>
УДК 615.074; 615.917



Обзорная статья/Review article

Примеси N-нитрозаминов в лекарственных средствах: токсичность, пути образования, методы определения и нормирование (обзор)

П. П. Щетинин^{1*}, С. П. Сенченко¹, К. К. Гордеев¹

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), 127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Щетинин Петр Павлович. E-mail: schetininpp@expmed.ru

ORCID: П. П. Щетинин – <https://orcid.org/0000-0003-4761-9372>; С. П. Сенченко – <https://orcid.org/0000-0003-0212-3840>; К. К. Гордеев – <https://orcid.org/0000-0002-4856-1320>.

Статья поступила: 30.09.2020. Статья принята в печать: 19.11.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Соединения N-нитрозаминов являются сильнодействующими генотоксическими агентами для млекопитающих, а некоторые из них классифицируются как вероятные канцерогены для человека. Недавно они были обнаружены в препаратах, принадлежащих к фармакологическим группам антагонистов рецепторов ангиотензина II, антагонистов H_1 -гистаминовых рецепторов и в синтетических сахароснижающих средствах. Это стало тревожным знаком в мировой фарминдустрии и запустило каскад международных исследований, призванных определить происхождение данной группы примесей в фармацевтических продуктах и обозначить пути минимизации риска от их присутствия.

Текст. Дан обзор современного состояния проблемы. Представлены основные пути образования N-нитрозаминов в лекарственных средствах на этапах от синтеза фармацевтической субстанции до хранения готового лекарственного препарата. Приведен основной механизм токсического действия данной группы примесей на организм человека. Кроме того, описаны методы экстрагирования и анализа N-нитрозаминов в лекарственных средствах. Показано, что высокоэффективная жидкостная хроматография и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором являются «золотым стандартом» определения вышеуказанных загрязнителей. Затронуты также основные принципы их нормирования.

Заключение. Приведенные данные дают представление о путях появления N-нитрозаминов в лекарственных средствах, о современных способах их обнаружения и нормирования в мировой практике. В то же самое время поднимается ключевой вопрос о необходимости разработки российских стандартов, регулирующих чистоту лекарственных средств в части присутствия нитрозаминовых примесей. В этом аспекте предлагается воспользоваться опытом ведущих фармрегуляторов США и ЕС.

Ключевые слова: примеси лекарственных средств, N-нитроамины, генотоксичные примеси, стандартизация, аналитический метод.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали участие в анализе материала и обсуждении текста статьи. П. П. Щетинин участвовал в сборе информации, её анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Щетинин П. П., Сенченко С. П., Гордеев К. К. Примеси N-нитрозаминов в лекарственных средствах: токсичность, пути образования, методы определения и нормирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>

N-nitrosamine Impurities in Medicines: Toxicity, Formation Pathways, Methods of Determination, and Limits (Review)

Petr P. Shchetinin^{1*}, Sergey P. Senchenko¹, Konstantin K. Gordeev¹

1 – FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovsky boulevard, Moscow, 127051, Russia

*Corresponding author: Petr P. Shchetinin. E-mail: schetininpp@expmed.ru

ORCID: Petr P. Shchetinin – <https://orcid.org/0000-0003-4761-9372>; Sergey P. Senchenko – <https://orcid.org/0000-0003-0212-3840>; Konstantin K. Gordeev – <https://orcid.org/0000-0002-4856-1320>.

Received: 30.09.2020. Revised: 19.11.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. N-nitrosamine compounds are potent genotoxic agents in animal species and some are classified as probable human carcinogens. This group of genotoxic impurities was found in drugs such as angiotensin II receptor blockers, histamine H1 receptor antagonists, and synthetic antidiabetic drugs. This discovery caused a flurry of alarm in the global pharmaceutical industry and resulted in a series of international investigations trying to determine root causes of nitrosamine formation in medicinal products and to find ways to minimize risks associated with nitrosamine contamination.

Text. This paper provides an overview of the current state of the problem. It summarises the main pathways of N-nitrosamine formation in medicinal products at the stages from synthesis of active pharmaceutical ingredients to storage of finished pharmaceutical products. The paper describes the main mechanism responsible for the toxic effect of this group of impurities in human body. It also describes methods of extraction and analysis of N-nitrosamines found in medicinal products. It was demonstrated that high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry are a golden standard for the detection of these contaminants. The paper also touches upon the main principles of setting limits for nitrosamine impurities in medicinal products.

© Щетинин П. П., Сенченко С. П., Гордеев К. К., 2020

© Shchetinin P. P., Senchenko S. P., Gordeev K. K., 2020

Conclusion. The data presented give a picture of the root causes of N-nitrosamine formation in medicinal products, as well as current detection and control methods used worldwide. Meanwhile, the paper raises a key issue about the need to develop Russian standards that would control the purity of medicinal products in terms of N-nitrosamine impurities. For that end, it will be necessary to draw on the experience of the leading USA and EU regulatory authorities.

Keywords: drug impurities, N-nitrosamines, genotoxic impurities, standardization, analytical method.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All the authors took part in the analysis of the material and discussion of the paper. Petr Shchetinin took part in the collection and analysis of data and writing of the paper.

For citation: Shchetinin P. P., Senchenko S. P., Gordeev K. K. N-nitrosamine impurities in medicines: toxicity, formation pathways, methods of determination, and limits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-180-190>

ВВЕДЕНИЕ

N-нитрозамины (НА) представляют собой класс органических азотсодержащих веществ, молекулы которых в своей структуре содержат алкилнитрозаминогруппу ($-\text{N}_2\text{O}-$), ассоциированную с двумя заместителями алкильной, арильной, алкарильной и т. д. природы (рисунок 1).

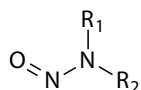


Рисунок 1. Общая структура нитрозаминовых соединений

Figure 1. General structure of N-nitrosamine compounds

В зависимости от структуры молекулы НА представляют собой кристаллический порошок или маслянистую жидкость. Ввиду большого дипольного момента НА умеренно растворимы в водных средах и легко растворимы во многих органических растворителях (дихлорметан, хлороформ, метанол и т. д.). Вещества этой группы также отличаются высокой летучестью и способны перегоняться с водяным паром. Относительная легкость диссоциации N—N связи при термической обработке является общим физическим свойством N-нитрозопроизводных, но требует воздействия высоких температур от 400 до 500 °C [1].

Номенклатура НА чрезвычайно разнообразна и ограничивается лишь числом возможных комбинаций радикалов в структуре молекулы. Однако на сегодняшний день особую актуальность имеют 7 НА соединений, поскольку их удалось выделить из фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, а также установить их структуру и оценить количественное содержание (рисунок 2) [2].

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА N-НИТРОЗАМИНОВ

Достоверно установлено, что соединения НА группы являются сильнодействующими генотоксическими агентами для млекопитающих, а неко-

торые из них классифицируются Международным агентством по изучению рака (*International Agency for Research on Cancer*) как вероятные или возможные канцерогены для человека и относятся к группам 2A и 2B. Как было показано, они вызывают мутагенез и канцерогенез у лабораторных животных, что приводит к серии высокоопасных онкологических заболеваний пищевода, желудка, прямой кишки, легких и т. д. [3]. Оценить степень влияния НА соединений на развитие рака у человека в рамках эпидемиологических исследований затруднительно в виду неочевидной взаимосвязи провоцирующего фактора (невозможность отделить от других провоцирующих воздействий на человека) с фактом развития заболевания. Однако имеются данные, свидетельствующие в пользу достоверного увеличения вероятности развития онкологических патологий в отдаленном периоде при систематической нагрузке организма НА в сверхдопустимых количествах [2]. Об этом также говорит и неспецифический механизм воздействия НА на генетический аппарат млекопитающих.

Вследствие метаболической активации НА, опосредованной ферментами семейства цитохромом P450 (α -гидроксилирование), происходит образование нестабильных α -гидроксиметил-N-нитрозамин, которые, метаболизируясь микросомальной системой окисления, преобразуются в ионы (свободные радикалы) алкил- или арилдиазония (рисунок 3) [4].

Ионы диазония являются крайне высокоактивными, в биологическом смысле, соединениями. Они ответственны за ковалентную модификацию ДНК посредством метилирования нуклеозидов. Метилирование ДНК, как известно, оказывает влияние на непосредственно транскрипцию через изменение эффективности связывания факторов транскрипции с соответствующими участками нуклеиновой кислоты, либо через формирование абсолютно неактивных в транскрипционном отношении ее участков. Наблюдаемое вследствие нитрозаминовой нагрузки гиперметилирование ДНК может опосредованно инициировать химический канцерогенез при накоплении

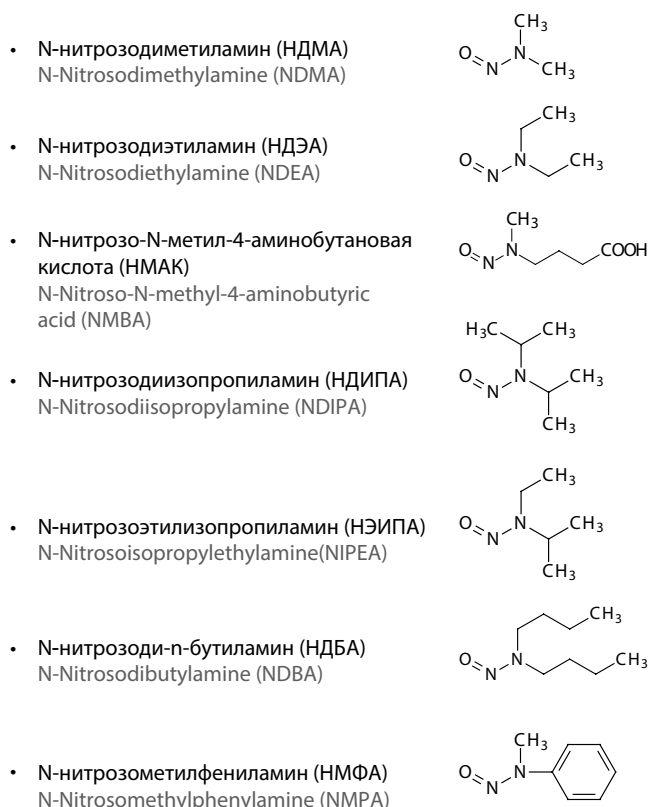


Рисунок 2. N-нитрозамины, обнаруженные в качестве примесей в лекарственных средствах

Figure 2. N-nitrosamines detected as impurities in medicines

критической массы указанных повреждений в генетическом аппарате. На рисунке 4 приведен пример метилирования одного из азотистых оснований в присутствии продукта метаболизма НА [5].

Образующийся побочно аддукт – формальдегид также самостоятельно является генотоксичным соединением и та его часть, которая не подверглась внутриклеточной детоксикации через окисление, еще больше усугубляет повреждение генетического аппарата [6].

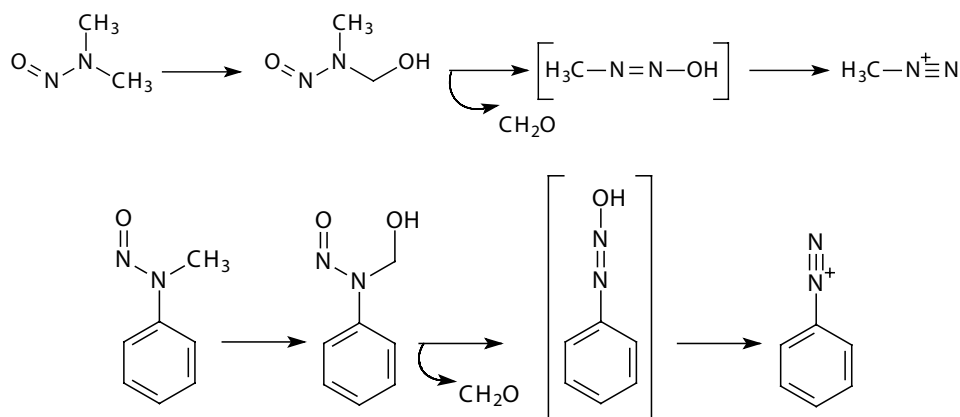


Рисунок 3. Схема метаболизма НДМА (верхняя реакция) и НМФА (нижняя реакция) в организме млекопитающих

Figure 3. Pathways of NDMA (upper reaction) and NMPA (lower reaction) metabolism in mammals

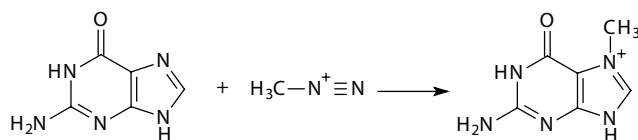


Рисунок 4. Метилирование гуанина под действием иона алкилдиазония

Figure 4. Alkyl diazonium ion methylation of guanine

Органами-мишенями, в первую очередь страдающими от нитрозаминового туморогенеза, являются печень и органы желудочно-кишечного тракта, а также почки и легкие, богатые специфическими пероксидазными ферментами. Кроме того, наблюдается кумуляция НА соединений в печени и их экскреция с желчью, что еще больше увеличивает вероятность малигнизации тканей гепатобилиарной системы [7].

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Группа НА соединений известна около 40 лет. По данным многочисленных научных исследований, НА в различных концентрациях встречаются в продуктах питания (вода, мясная продукция, копчения и т.д.), сигаретах, курительных смесях и т.д. Однако в 2018 г. было впервые акцентировано внимание на присутствие НА в лекарственных препаратах. До этого времени НА не рассматривались как фармацевтические примеси и их обязательный учет не требовался при регистрации лекарственных средств. Данная группа веществ последовательно была обнаружена в препаратах, принадлежащих к фармакологическим группам антагонистов рецепторов ангиотензина II (лозартан, валсартан, ирбесартан, кандесартан, олмесартан, фимасартан), антагонистов H_1 -гистаминовых рецепторов (ранитидин, низатидин), а также в синтетических сахароснижающих средствах (метформин). Необходимо, однако, отметить, что каждая из перечисленных

групп лекарственных средств имела для этого определенные структурные предпосылки. О них будет сказано далее.

После появления данных об обнаружении НА контаминантов в лекарственных средствах было проведено несколько крупных межгосударственных мультидисциплинарных расследований, которые сегодня дают возможность утверждать, что образование НА в лекарственных средствах возможно в ходе синтеза фармакологически активного или вспомогательного вещества; в процессе деградации фармакологически активного или вспомогательного вещества или некоторыми иными способами.

Как правило, любые процессы, в которых используются нитриты в присутствии вторичных, третичных или четвертичных аминов, потенциально подвержены риску образования примесей НА. Установлено, что НА могут образовываться из аминов в присутствии нитрозирующих агентов (обычно окисленных азотсодержащих соединений) в определенных условиях реакции (рисунок 5) [8].

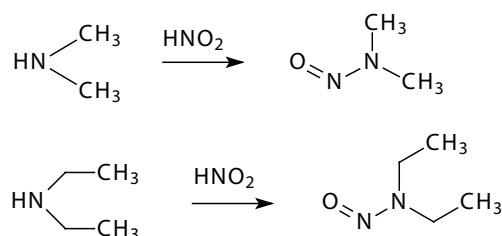


Рисунок 5. Принципиальная схема образования НДМА (верхняя реакция) и НДЭА (нижняя реакция) из вторичных аминов в присутствии азотистой кислоты

Figure 5. Schematic diagram of NDMA (upper reaction) and NDEA (lower reaction) formation from secondary amines in the presence of nitrous acid

Нитрозирующие агенты имеют различную реакционную способность и могут по-разному реагировать с аминами в зависимости, например, от pH реакционной среды и природы растворителя. Пред-

полагается, что реакция протекает за счет различных нитрозирующих соединений, образующихся преимущественно в кислотных условиях.

В случае препаратов группы сартанов, в качестве вероятных нитрозирующих агентов, отвечающих за образование НА, были определены натрия нитрит и, потенциально, азотистая кислота [8]. Известны и другие соединения, которые нитрозируют амины. Например, алкилнитриты, азотистый ангидрид (N_2O_3), тетраоксид диазота (N_2O_4), нитрозила хлорид (NOCl) или другие галогениды, нитрозила тиоцианат и нитрозофенол. Некоторые из них используются при производстве фармацевтических субстанций в качестве реактивов, но они также могут быть получены и в виде побочных продуктов синтеза.

Особое место занимает механизм образования НА, в схемах, где азотистая кислота используется для гашения остаточного азидата. Натрия азид широко применяется в промышленном химическом синтезе для образования тетразольного кольца (например, у некоторых антагонистов рецепторов ангиотензина II) или введения азидной функциональной группы в молекулу в присутствии аминов-предшественников (рисунок 6). Именно этот механизм ответственен за появление впервые обнаруженных НА примесей в препаратах сартанового ряда.

Амидные растворители, которые подвержены разложению при определенных условиях реакции, являются еще одним источником вторичных аминов. Например, при длительном воздействии высокой температуры N,N-диметилформамид (ДМФА) может разлагаться до диметиламина, который способен реагировать с азотистой кислотой с образованием НДМА (рисунок 7) [8].

N-метилпирролидон, N,N-диметилацетамид и N,N-диэтилацетамид также имеют аналогичные пути разложения с образованием вторичных аминов, которые могут реагировать с азотистой кислотой с образованием НА примесей. Вторичные амины также могут присутствовать в качестве примесей в амидных растворителях. Например, диметиламин, который

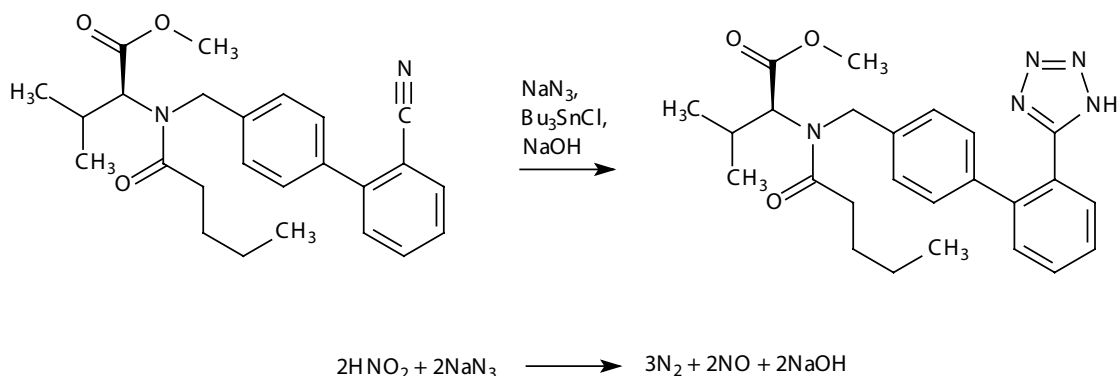


Рисунок 6. Схема синтеза валсартана на этапе образования тетразольного кольца (верхняя реакция) и реакция гашения остаточного азидата (нижняя реакция)

Figure 6. Scheme of valsartan synthesis at the stage of tetrazole ring formation (upper reaction) and the reaction of quenching of the residual azide (lower reaction)

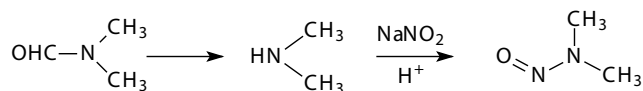


Рисунок 7. Принципиальная схема образования НДМА из ДМФА в присутствии азотистой кислоты

Figure 7. Schematic diagram of NDMA formation from N,N-dimethylformamide in the presence of nitrous acid

может реагировать с азотистой кислотой с образованием НДМА, может присутствовать в качестве примеси в ДМФА.

Этот список источников генерации НА не является исчерпывающим, поскольку аминные реагенты могут использоваться для осуществления широкого диапазона синтетических превращений. По этой причине производителям надлежит оценивать другие реагенты, содержащие функциональные аминогруппы, на предмет потенциального риска образования НА.

Примеси НА могут быть внесены в фармацевтические субстанции также, когда материалы поставщиков, включая исходные материалы и сырье, загрязнены. Например, обнаружено, что загрязнение НА происходило, когда свежие растворители (о-ксилол, толуол и хлористый метилен) перемещались между транспортировочными емкостями поставщика и резервуарами хранения покупателя.

Осведомленность о цепочке поставок сырья является важным фактором предотвращения загрязнения. Например, производители фармацевтических субстанций могут не знать о загрязнении НА в сырье или исходных материалах, которые они получили от поставщиков; производитель, чей производственный процесс обычно не подвержен образованию НА, может не осознавать, что материал, полученный от продавца, мог содержать примеси, внесенные во время производства или транспортировки. Лекарственные средства также могут подвергаться риску перекрестного загрязнения, если они производятся на объектах, где примеси НА образуются в других процессах.

Другим потенциальным источником образования примесей НА является отсутствие оптимизации процесса производства фармацевтической субстанции, когда условия реакции, такие как температура, pH или последовательность добавления реагентов, промежуточных продуктов или растворителей, являются неподходящими или плохо контролируемыми. Документировались многократные случаи, когда условия реакции сильно различались между партиями и даже между разным технологическим оборудованием на одном предприятии для одной и той же фармацевтической субстанции [9].

Интересно, что некоторые готовые лекарственные средства могут подвергаться путям разложения с образованием примесей НА; это потенциально может произойти во время хранения лекарственного препарата, в том числе при нарушении предписан-

ных условий. Например, в случае ранитидина установлены механизмы разложения при хранении, увеличении температуры, а также в среде организма (рисунок 8) [10].

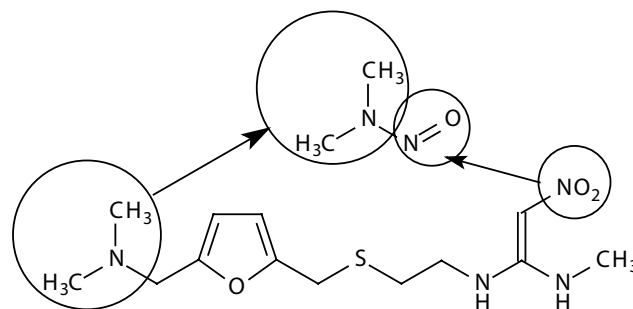


Рисунок 8. Схема «внутреннего» образования НДМА в лекарственном средстве «Ранитидин»

Figure 8. Scheme of «internal» formation of NDMA in the drug «Ranitidine»

В молекуле ранитидина на рисунке 8 выделены участки, которые при разложении препарата способны отщеплять нитрозогруппу и диметиламин. Образовавшиеся соединения могут приводить к образованию НДМА. Идеальные условия для протекания этой реакции может предоставить желудочный сок. В кислой среде желудка возможно их взаимодействие с образованием НА.

Разложение ранитидина, как стало известно, способно также запуститься при ненадлежащем хранении (например, при увеличении температуры). Так, в экспериментальных целях установлено, что даже при краткосрочной экспозиции фармацевтической субстанции при 130 °C уровень НДМА начинает повышаться и в итоге значительно превышает допустимый предел ее потребления. Таким образом, возможно возникновение примесей НА *in situ* [10].

Следовательно, риск образования примесей НА напрямую зависит от структуры молекулы лекарственного средства, поэтому целесообразно выделять соединения с наибольшей вероятностью физико-химической деградации с образованием соединений данного класса. Уровень риска образования НА при хранении предсказуемо максимален для веществ, содержащих амино- и нитрогруппы. Фактические данные по обнаружению НА в фармацевтических субстанциях поддерживают данный тезис [11].

Также к образованию НА может приводить использование определенных материалов упаковки. Контаминация НА соединениями наблюдалась у лекарственных препаратов, упакованных в блистер с покровной фольгой, содержащей нитроцеллюлозу. Было установлено, что НА образуются в процессе термической склейки блистерной упаковки из продуктов деградации нитроцеллюлозы и низкомолекулярных аминов, присутствующих либо в типографской краске, либо в препарате.

Таким образом, спектр реакций, способных привести к генерации НА примесей, весьма широк, но главной из них, вероятно, является все же реакция нитрозирования аминов.

Поскольку на сегодняшний день достоверно показана высокая вероятность образования НА в ходе реакции взаимодействия азотистой кислоты с аминами-предшественниками, то можно предполагать, что потенциально загрязненными могут быть многие лекарственные средства из самых разных фармакотерапевтических групп.

В научной литературе сообщается о значительном числе других фармацевтических субстанций, которые точно или предположительно могут быть загрязнены НА: аминопирамин, амитриптилин, азитромицин, бензалкония хлорид, карабиноксамин, хлорамфеникол, хлорфенамин, хлорпромазин, хлорпротиксен, хлортетрациклин, циталограм, кларитромицин, кломипрамин, дименгидромин, дилтиазем, дифенгидрамин, докsepин, доксиламин, эритромицин, эсциталограм, имипрамин, меропенем, метформин, метапирилен, метилтионина хлорид, мифепристон, миноциклин, низатидин, олеандомицин, окситетрациклин, пирамидон, промазин, пропоксифен, хинупристин, ранитидин, рокситромицин, спирамицин, суматриптан, тримипрамин, тетрациклин, трамадол, венлафаксин и т. д. [12].

Также в химии белков применяются органические азиды, а значит, и химически синтезированные белки тоже становятся кандидатами для более тщательных исследований на предмет возможной контаминации НДМА.

НОРМИРОВАНИЕ ПРИМЕСЕЙ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Как упоминалось выше, НА представляют собой вещества «когорты, вызывающей опасения». Таким образом, теоретический избыточный риск развития онкологических заболеваний при долгосрочном применении лекарственных препаратов, содержащих НА, составляет около 1 случая на 100 тыс. человек. Расчет допустимого поступления НА предполагает ежедневное введение максимальной суточной дозы лекарственного средства в течение всей жизни и основан на подходе, изложенном в руководстве ICH M7 (R1).

Ко всем способам введения применим один и тот же подход к оценке рисков. Корректировки предельных значений, как правило, недопустимы, если различия в зависимости от способа введения не подтверждены специфическими данными.

Для определения предельных значений в случае присутствия более одного НА соединения приемлемыми считаются два подхода, позволяющие не превысить приемлемый уровень риска 1:100000 в соответствии с руководством ICH M7 (R1):

- 1) общее суточное потребление всех идентифицированных НА не должно превышать значения приемлемого поступления наиболее активного идентифицированного НА, или
- 2) общий уровень риска, рассчитанный для всех идентифицированных НА, не должен превышать 1:100000.

С учетом всех имеющихся рекомендаций рассчитаны допустимые пределы содержания НА примесей в лекарственных средствах (таблица 1). Данные нормы принято считать временными в течение ближайших 2 лет. В соответствии с ними производителям надлежит принять меры для количественного определения уровней НА в своих лекарственных средствах и уменьшить или удалить эти примеси при превышении. В противном случае лекарственное средство будет изыматься из оборота соответствующим фармрегулятором.

Таблица 1. Максимально допустимая суточная доза нитрозаминов в лекарственных средствах [13]

Table 1. The maximum permissible daily dose of N-nitrosamine impurities in medicines [13]

Наименование примеси Impurity name	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day
НДМА NDMA	≤96,0
НДЭА NDEA	≤26,5
НМАК NMBA	≤96,0
НДИПА NDIPA	≤26,5
НЭИПА NIEPA	≤26,5

Предельное значение содержания НА примесей, выраженное в частях на миллион (ppm), для каждого из лекарственных средств возможно определить расчетным методом. Пример таких расчетов для антагонистов рецепторов ангиотензина II, имеющих тетразольную структуру, исходя из максимальной суточной дозы действующего вещества и допустимой суточной дозы НА, приведен в таблице 2.

Показательным является, то что в одной из ведущих фармакопей мира – Европейской фармакопее, испытание лекарственных средств на НА чистоту упомянуто в крайне ограниченном числе утвержденных монографий (прежде всего, на антагонисты рецепторов ангиотензина II), но даже в них перечислены нормы на немногие N-нитрозосоединения (как правило, НДМА и НДЭА), в то время как остальные остаются без внимания.

Следуя вышесказанному, а также учитывая обширность списка потенциально загрязненных лекарственных средств, по нашему мнению, правильным будет разработка, обсуждение и утверждение общей монографии или общей фармакопейной статьи, которая будет представлять собой логическое смысловое продолжение рекомендаций руководства ICH M7

(R1) о необходимости контроля любого лекарственного средства, в случае если есть основания ожидать появления НА в готовых фармацевтических субстанциях или лекарственных препаратах.

Таблица 2. Рассчитанные предельные значения примесей НДМА и НДЭА в лекарственных средствах антагонистов рецепторов ангиотензина II (пример)

Table 2. Calculated limits for NDMA and NDEA impurities in angiotensin II receptor blockers (example)

Лекарственное средство / максимальная суточная доза Drug/maximum daily dose	НДМА NDMA		НДЭА NDEA	
	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day	Предельное значение, ppm Limit value, ppm	Допустимая суточная доза, нг/сут Acceptable intake, ng/day	Предельное значение, ppm Limit value, ppm
Кандесартан / 32 мг Candesartan / 32 mg	≤96,0	3,000	≤26,5	0,820
Ирбесартан / 300 мг Irbesartan / 300 mg	≤96,0	0,320	≤26,5	0,088
Лозартан / 150 мг Losartan / 150 mg	≤96,0	0,640	≤26,5	0,177
Олмесартан / 40 мг Olmesartan / 40 mg	≤96,0	2,400	≤26,5	0,663
Валсартан / 320 мг Valsartan / 320 mg	≤96,0	0,300	≤26,5	0,082

Кроме того, в ближайшем будущем предстоит пересмотреть приведенные временные допустимые пределы содержания НА в лекарственных средствах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ N-НИТРОЗАМИНОВ ИЗ ИСПЫТУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Для выделения НА практически используются несколько методов. Первый из них – твердофазная экстракция. В фармацевтической практике этот вариант не нашел широкого распространения и применяется в основном для анализа воды на содержание в ней, в том числе НА загрязнителей. Из испытуемого образца аналит сорбируется подходящим сорбентом, в качестве которого чаще всего используется уголь активированный, а затем вымывается с его поверхности подходящим растворителем, который далее используется для определений. Альтернативно может быть применена паровая или вакуумная дистилляция НА, после которой следует жидкость-жидкостная экстракция с использованием растворителей, образующих несмешиваемые фазы. Чаще этот метод применяется как один из этапов подготовки проб при анализе продуктов питания [14].

В фармацевтическом же анализе наиболее часто используется прямая жидкостная экстракция НА из испытуемого образца. Лекарственное средство при

необходимости измельчают, растворяют в метаноле, при необходимости обрабатывают ультразвуком или перемешивают на вортексе, фильтруют через подходящий фильтр и доводят объем раствора водой до необходимой концентрации определяемого вещества. Полученный экстракт анализируют одним из аналитических методов определения.

При проведении любого из видов экстракции важно помнить о том, что применяемые растворители с недостаточной квалификацией чистоты, как было сказано выше, сами могут быть загрязнены НА. Например, дихлорметан (наиболее известный растворитель для жидкость-жидкостной экстракции НА) может в 27–40 % случаев содержать НДМА. Нередко также при использовании в качестве растворителя дистиллированной воды при анализе на НА появлялся интерферирующий пик [15].

При выделении НА (особенно НДМА) необходима предельная осторожность в силу сообщений о зависящей от pH их нестабильности [16] и о фотолизе [17], которые могут привести к занижению реальной концентрации НА. И, напротив, концентрацию НА можно переоценить из-за внутреннего нитрозирования присутствующих в пробе аминов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-НИТРОЗАМИНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) имеет особое значение для фармацевтического анализа лекарственных средств. Она широко и наиболее часто используется для определения примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах, а также для разделения сложных биологических смесей и композиций природных биологически активных соединений. Этот метод отличается высокой универсальностью и повсеместная распространённость. Для определения НА применяют ВЭЖХ на обращенно-фазовых колонках (главным образом, C8 или C18).

Наиболее доступным, но, в то же самое время, наименее селективным и чувствительным методом определения НА является ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектором (ВЭЖХ-УФ). Первоначально о возможности обнаружении НДМА посредством ВЭЖХ-УФ в диапазоне длин волн 230–233 нм сообщали W. Li и др. [18], и M. Al-Kaseem и др. [19]. Позднее некоторые фармрегуляторы также предложили свои методики. Французское национальное агентство по безопасности лекарственных средств и товаров медицинского назначения (*French National Agency for Medicines and Health Products Safety*) разработали и опубликовали ВЭЖХ-УФ методику определения НДМА и НДЭА в фармацевтических субстанциях валсартана, лозартана, ирбесартана, кандесартана и олмесартана. В методике используется градиентный режим хроматографирования и аналитическая колонка с силикагелем ок-

тадецилсилильным, эндкепированным, $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм, детектирование ведется при длине волны 228 нм. Для указанных методик ВЭЖХ-УФ предел количественного определения (LOQ) и предел обнаружения (LOD) составляют соответственно: для НДМА 0,04–0,25 ppm и 0,02–0,1 ppm, для НДЭА 0,08–0,50 ppm и 0,04–0,10 ppm в зависимости от испытуемого лекарственного средства.

Напротив, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) обладает высокой чувствительностью и селективностью, но, в то же самое время, требуется оборудование, которое представлено далеко не в каждой аналитической лаборатории. Однако это не помешало методу ВЭЖХ-МС стать одним из представителей «золотого стандарта» в области определения НА примесей в лекарственных средствах. Международными фармрегуляторами предложено не менее 7 методик. В каждой из них используются один из двух методов ионизации – ионизация электрораспылением (ESI) или химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Хроматографические условия некоторых методик приведены в таблице 3. В большинстве представленных методик используется внутренний стандарт.

Как видно из представленной таблицы, общепринятые в международной практике методы различаются LOD и LOQ, используемыми аналитическими колонками (сорбент, размер зерна и геометрия), а также способами ионизации аналита. Подвижная фаза в целом стереотипна. Используется градиентный режим элюирования, который призван повысить производительность хроматографической системы.

Первичный анализ приведенных данных очевидно демонстрирует, что чувствительность ВЭЖХ-МС значительно превосходит таковую у ВЭЖХ-УФ. Однако немаловажным остается вопрос аппаратного оснащения некоторых из представленных методик. Например, в методике № 1 (FDA) (таблица 3) разработчики предусматривают использование конкретного оборудования, поскольку все условия оптимизированы под определенную крайне дорогостоящую хромато-масс-спектрометрическую систему, снабженную орбитальной ионной ловушкой (орбитрэпом).

Газовая хроматография (ГХ) также является одним из двух самых распространенных методов, помимо ВЭЖХ-МС. Он оптимально подходит для анализа НА примесей, учитывая их высокую летучесть при нагревании (низкая точка кипения, например у НДМА, около 154 °C) [20]. Однако данным методом нельзя определять НА в лекарственных средствах, образующих НА примеси *in situ* под воздействием высоких температур (например, ранитидин). Для этих целей лучше подойдет ВЭЖХ-МС.

В открытом доступе представлено не менее 8 методик определения НА примесей методом ГХ-МС. Подробные условия хроматографирования приведены в таблице 4. В большинстве методик также используется внутренний стандарт.

Метод ГХ-МС можно описать большинством характеристик, приведенных для ВЭЖХ-МС. Важнейшее из них то, что сочетание разделения с помощью ГХ и обнаружения с помощью МС-детектора позволяет достичь значений LOD, которые подходят для анализа НА, содержащихся даже в ультраследовых количествах.

Другие методы определения НА также встречаются в научной литературе. Полярография, об успехах которой в определении НА отчитывались первоначально, позже оказалась недостаточно селективной, и, скорее всего, больше не будет применяться для анализа НА [21]. Электрофоретическое разделение также обладает очевидным минусом – сравнительно низкой чувствительностью. Другой метод – колориметрический анализ, основанный на реакции Эйзенбранда – Пройсмана [22, 23]. После обработки НА с помощью HBr в уксусной кислоте образующийся нитрит обнаруживается колориметрически [24]. Он, как и прочие «другие методы», используется в основном с целью грубого скрининга на присутствие группы НА примесей в лекарственном средстве [25].

Следовательно, в настоящее время из-за высокой чувствительности МС-детекторов методы с их использованием остаются наиболее популярным выбором при определении НА. Кроме того, развитие МС-анализаторов еще больше облегчило углубленное изучение НА в сложных матрицах, к которым, безусловно, можно отнести любой лекарственный препарат. Из-за летучести большинства НА наиболее распространенным является анализ ГХ-МС. Вместе с тем ВЭЖХ-МС также обладает хорошими характеристиками селективности и чувствительности. Все прочие методы, вероятно, стоит рассматривать лишь при невозможности использования двух последних.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре приведены современные данные, относительно токсичности и механизма токсического действия НА. Показано превалирующее значение ионов диазония, генерируемых в ходе метаболизма НА, а также побочного аддукта – формальдегида, которые в совокупности приводят к ковалентной модификации пуриновых оснований ДНК посредством метилирования и последующего нарушения процессов транскрипции с опосредованным канцерогенезом в органах-мишенях. Представлены компромиссные общепринятые подходы к нормированию данной группы примесей на двухлетний переходный период. Приведенные предельные значения содержания НА в лекарственных препаратах, как считается, не способны нанести критического воздействия на организм даже при пожизненном применении последних в высоких терапевтических дозировках. Рассмотрены методы выделения примесей НА из испытуемых образцов и методы их последующего анализа. Продемонстрирован широкий спектр методик от низкоселективных и низкочувствительных до современных, не обладаю-

Таблица 3. Условия хроматографирования в некоторых официально утвержденных фармрегуляторами методиках определения НА (ВЭЖХ-МС)

Table 3. Chromatographic conditions described in some official methods for N-nitrosamine compounds determination (HPLC-MS) approved by regulatory agencies

№	Хроматографическая колонка Chromatographic column	Подвижная фаза (ПФ)/режим элюирования Mobile phase (MP)/elution mode	Режим ионизации Ion source	LOQ/LOD
1	Kinetex 2.6 μm , 100 $\times$ 4.6 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,05/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,016 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,05/0,003 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,05/0,008 ppm), НДБА (NDBA) (0,05/0,005 ppm), НМАК (NMBA) (0,05/0,010 ppm)
2	XTerra MS C18 3.5 μm , 100 $\times$ 3.0 mm	ПФА: Вода ПФБ: Метанол <i>Градиентный режим</i> MP A: water MP B: methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,079–0,492/0,024–0,148 ppm), НДЭА (NDEA) (0,0195–0,149/0,082–0,177 ppm)
3	Luna C8(2) 5.0 μm , 150 $\times$ 2.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	ESI	НДМА (NDMA) (0,0286/0,0086 ppm)
4	XSelect HSS 3.5 μm , 150 $\times$ 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Муравьиной кислоты раствор спиртовой 0,1 % <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: 0.1% formic acid in methanol <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (0.10 / 0,5 ppm), НДЭА (NDEA) (0.10/0,5 ppm)
5	XSelect HSS 3.5 μm , 150 $\times$ 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,2 % ПФБ: ацетонитрил метанол 200:1000 <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.2% formic acid in water MP B: acetonitrile – methanol 200:1000 <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (–/0,05 ppm)
6	Waters HSS-T3 1.8 μm , 100 $\times$ 3.0 mm	ПФА: Муравьиной кислоты раствор водный 0,1 % ПФБ: Метанол <i>Градиентный режим</i> MP A: 0.1% formic acid in water MP B: methanol <i>Gradient Mode</i>	APCI	НДМА (NDMA) (0,2/0,08 ppm)

Примечание. Представленные методики приведены в свободном доступе на сайте EDQM: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Note. The presented methods are freely available on the EDQM website: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

щих такими изъянами, от требующих использования уникального дорогостоящего оборудования до ограничивающихся использованием рутинного оснащения. Каждый из методов отличается от остальных не только спектром определяемых примесей, но также и показателями чувствительности, выраженными LOQ и

LOD. Таким образом, практически любая аналитическая лаборатория способна подобрать для себя наиболее оптимальный вариант из спектра приведенных аналитических методов для обнаружения и количественной оценки нитрозаминов и использовать его для определений.

Таблица 4. Условия хроматографирования в некоторых официально утвержденных фармрегуляторами методиках определения НА (ГХ-МС)**Table 4.** Chromatographic conditions described in some official methods for N-nitrosamine compounds determination (GC-MS) approved by regulatory agencies

№	Хроматографическая колонка Chromatographic column	Газ-носитель / скорость потока / деление потока Carrier gas / flow rate / split ratio	Режим ионизации (детектирования) Ion source (acquisition Type)	LOQ/LOD
1	VF-WAXms GC 1.0 µm, 30 m × 0.25 mm,	Гелий / 1,0 мл/мин / – Helium / 1,0 ml/min / –	EI	НДМА (NDMA) (0,05/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,03/0,01 ppm)
2	Restek Rtx-624 1.8 µm, 30 m × 0.32 mm	Гелий / 1,52 мл/мин / – Helium / 1,52 ml/min / –	EI	НДМА (NDMA) (0,10/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,08/0,02 ppm)
3	DB-1701 GC 1.00 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / 5:1 Helium / 1,0 ml/min / 5:1	SIM	НДМА (NDMA) (0,10/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,02 ppm)
4	DB-Wax GC 0.5 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / 5:1 Helium / 1,0 ml/min / 5:1	SIM	НДМА (NDMA) (0,05/0,01 ppm), НДЭА (NDEA) (0,05/0,01 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,05/0,025 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,05/0,025 ppm)
5	VF-WAXms GC 1.00 µm, 30 m × 0.25 mm	Гелий / 1,0 мл/мин / – Helium / 1,0 ml/min / –	MRM	НДМА (NDMA) (0,008/0,005 ppm), НДЭА (NDEA) (0,005/0,001 ppm), НЭИПА (NIPEA) (0,005/0,001 ppm), НДИПА (NDIPA) (0,005/0,001 ppm), НДБА (NDBA) (0,025/0,010 ppm)
6	a) VF-624ms 1.4 µm, 30m × 0.25 mm, б) Deactivated Fused Silica, 1.35m × 0.15 mm	a) Гелий / 1,3 мл/мин / – б) Гелий / 1,45 мл/мин / – a) Helium / 1,3 ml/min / – b) Helium / 1,45 ml/min / –	ES	НДМА, НДЭА, НЭИПА, НДИПА и НДБА (NDMA, NDEA, NIPEA, NDIPA and NDBA) (15 ppb/–)

Примечание. Представленные методики приведены в свободном доступе на сайте EDQM: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Note. The presented methods are freely available on the EDQM website: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

Особый акцент сегодня необходимо сделать на пока еще полном отсутствии в России собственных стандартов качества лекарственных средств в части содержания примесей НА. Безусловно, необходимо разрабатывать такие нормирующие документы, основываясь на уже имеющемся международном позитивном опыте. В противном случае имеющийся нормативный разрыв далее будет усугубляться и самым отрицательным образом сказываться на безопасности лекарственных средств, находящихся в гражданском обороте на территории России.

ЛИТЕРАТУРА

- Perera A. M. A. Chromatographic analysis of the environment, 3rd Ed. United States. 2006.
- Nitrosamine impurities in human medicinal products (Assessment report). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learned-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
- Magee P. N. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention*. 1996;5:7-10.
- George J., Tsuchishima M., Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell Death and Disease*. 2019;10(18). DOI:10.1038/s41419-018-1272-8.
- Allis J. W., Brown B. L., Simmons J. E., Hatch G. E., McDonald A., House D. E. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450. *Toxicology*. 1996;112(2):131–140. DOI: 10.1016/0300-483x(96)03366-5.
- Kawanishi M., Matsuda T., Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers Environmental Science*. 2014;2:36. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
- Sheweita S. A., El Banna Y. Y., Balbaa M., Abdullah I. A., Hassan H. E. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2212–2220. DOI: 10.1002/tox.22436.
- Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines (Overview and recommendations). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learned-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.

9. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs (Guidance for Industry). USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
10. Shen R., Andrews S. A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: the role of pH. *Water research*. 2013;47(2):802–810. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.004.
11. Хорольский М. Д., Чапленко А. А., Власов А. М., Масленникова Н. В., Раменская Г. В. Примеси нитрозаминов в лекарственных препаратах: пути образования и механизмы токсического действия. *Медицина*. 2019;7(4):12–24. DOI: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-12-24.
12. Parr M. K., Joseph J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;164:536–549. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.010.
13. Information Note Nitrosamine impurities. Switzerland: WHO. Available at: https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/.
14. Shaik K. M., Sarmah B., Wadekar G. S., Kumar P. Regulatory updates and analytical methodologies for nitrosamine impurities detection in sartans, ranitidine, nizatidine, and metformin along with sample preparation techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2020:1–19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375.
15. Dawson B. A., Lawrence R. C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70:554–556.
16. Grebel J. E., Young C. C., Suffet I.H. Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*. 2006;1117(1):11–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.044.
17. Roux J. L., Gallard H., Croue J. P., Papot S., Deborde M. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science and Technology*. 2012;46(20):11095–11103. DOI: 10.1021/es3023094.
18. Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammd N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products. *Analytical Methods*. 2018;10:1733–1739. DOI: 10.1039/C8AY00014J.
19. Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F., A rapid validated RP-HPLC method for the determination of seven volatile N-nitrosamines in meat. *Pharmacology and pharmacy*. 2014;5:298–308. DOI: 10.4236/pp.2014.53037.
20. Cowley E. G., Partington J. R. Dielectric polarization. The dipole moments of some nitrosoamines, p-nitrosophenol, ethylaniline, hydrazobenzene and benzaldehyde phenylhydrazone. *Journal of the Chemical Society*. 1933:1255–1257.
21. Fiddler W. The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975;3(31):352–360. DOI: 10.1016/0041-008X(75)90256-2.
22. Telling G. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1:277–280.
23. Eisenbrand G., Preussmann R. A new method for the colorimetric determination of nitrosamines after cleavage of the N-nitroso-group with hydrogen bromide in glacial acetic acid. *Arzneimittel-forschung*. 1970;10(20):1512–1517.
24. Ceh L., Ender F. A sensitive method for the colorimetric determination of volatile nitrosamines in food products and air. *Food and cosmetics toxicology*. 1978;2(16):117–121.
25. Roback S.L., Kodamatani H., Fujioka T., Plumlee M.H. Validation of a novel direct-injection chemiluminescence-based method for N-nitrosamine analysis in advanced-treated recycled water, drinking water, and wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2020; 4(6): 1106–1115. DOI: 10.1039/C9EW00943D.
5. Allis J. W., Brown B. L., Simmons J. E., Hatch G. E., McDonald A., House D. E. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450. *Toxicology*. 1996;112(2):131–140. DOI: 10.1016/0300-483x(96)03366-5.
6. Kawanishi M., Matsuda T., Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers Environmental Science*. 2014;2:36. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
7. Sheweita S. A., El Banna Y. Y., Balbaa M., Abdullah I. A., Hassan H. E. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2212–2220. DOI: 10.1002/tox.22436.
8. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines (Overview and recommendations). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
9. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs (Guidance for Industry). USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
10. Shen R., Andrews S. A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: the role of pH. *Water research*. 2013;47(2):802–810. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.004.
11. Khorolskiy M.D., Chaplenko A.A., Vlasov A.M., Maslennikova N. V., Ramenskaya G. V. Nitrosamine impurities in drugs: pathways of formation and mechanisms of toxic action. *Medicina*. 2019;7(9):12–24. DOI: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-12-24. (In Russ.).
12. Parr M. K., Joseph J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;164:536–549. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.010.
13. Information Note Nitrosamine impurities. Switzerland: WHO. Available at: https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/.
14. Shaik K. M., Sarmah B., Wadekar G. S., Kumar P. Regulatory updates and analytical methodologies for nitrosamine impurities detection in sartans, ranitidine, nizatidine, and metformin along with sample preparation techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2020:1–19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375.
15. Dawson B. A., Lawrence R. C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70:554–556.
16. Grebel J. E., Young C. C., Suffet I.H. Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*. 2006;1117(1):11–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.044.
17. Roux J. L., Gallard H., Croue J. P., Papot S., Deborde M. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science and Technology*. 2012;46(20):11095–11103. DOI: 10.1021/es3023094.
18. Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammd N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products. *Analytical Methods*. 2018;10:1733–1739. DOI: 10.1039/C8AY00014J.
19. Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F., A rapid validated RP-HPLC method for the determination of seven volatile N-nitrosamines in meat. *Pharmacology and pharmacy*. 2014;5:298–308. DOI: 10.4236/pp.2014.53037.
20. Cowley E. G., Partington J. R. Dielectric polarization. The dipole moments of some nitrosoamines, p-nitrosophenol, ethylaniline, hydrazobenzene and benzaldehyde phenylhydrazone. *Journal of the Chemical Society*. 1933:1255–1257.
21. Fiddler W. The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975;3(31):352–360. DOI: 10.1016/0041-008X(75)90256-2.
22. Telling G. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1:277–280.
23. Eisenbrand G., Preussmann R. A new method for the colorimetric determination of nitrosamines after cleavage of the N-nitroso-group with hydrogen bromide in glacial acetic acid. *Arzneimittel-forschung*. 1970;10(20):1512–1517.
24. Ceh L., Ender F. A sensitive method for the colorimetric determination of volatile nitrosamines in food products and air. *Food and cosmetics toxicology*. 1978;2(16):117–121.
25. Roback S.L., Kodamatani H., Fujioka T., Plumlee M.H. Validation of a novel direct-injection chemiluminescence-based method for N-nitrosamine analysis in advanced-treated recycled water, drinking water, and wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2020; 4(6): 1106–1115. DOI: 10.1039/C9EW00943D.

REFERENCES

1. Perera A. M. A. Chromatographic analysis of the environment, 3rd Ed. United States. 2006.
2. Nitrosamine impurities in human medicinal products (Assessment report). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf.
3. Magee P. N. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention*. 1996;5:7-10.
4. George J., Tsuchishima M., Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell Death and Disease*. 2019;10(18). DOI:10.1038/s41419-018-1272-8.
5. Allis J. W., Brown B. L., Simmons J. E., Hatch G. E., McDonald A., House D. E. Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: The central role of cytochrome P450. *Toxicology*. 1996;112(2):131–140. DOI: 10.1016/0300-483x(96)03366-5.
6. Kawanishi M., Matsuda T., Yagi T. Genotoxicity of formaldehyde: molecular basis of DNA damage and mutation. *Frontiers Environmental Science*. 2014;2:36. DOI: 10.3389/fenvs.2014.00036.
7. Sheweita S. A., El Banna Y. Y., Balbaa M., Abdullah I. A., Hassan H. E. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental toxicology*. 2017;32(9):2212–2220. DOI: 10.1002/tox.22436.
8. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines (Overview and recommendations). The Netherlands: European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf.
9. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs (Guidance for Industry). USA: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/141720/download>.
10. Shen R., Andrews S. A. Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: the role of pH. *Water research*. 2013;47(2):802–810. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.004.
11. Khorolskiy M.D., Chaplenko A.A., Vlasov A.M., Maslennikova N. V., Ramenskaya G. V. Nitrosamine impurities in drugs: pathways of formation and mechanisms of toxic action. *Medicina*. 2019;7(9):12–24. DOI: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-12-24. (In Russ.).
12. Parr M. K., Joseph J. F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;164:536–549. DOI:10.1016/j.jpba.2018.11.010.
13. Information Note Nitrosamine impurities. Switzerland: WHO. Available at: https://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/InformationNote_Nitrosamine-impurities/en/.
14. Shaik K. M., Sarmah B., Wadekar G. S., Kumar P. Regulatory updates and analytical methodologies for nitrosamine impurities detection in sartans, ranitidine, nizatidine, and metformin along with sample preparation techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2020:1–19. DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375.
15. Dawson B. A., Lawrence R. C. Analysis of selected drug formulations for volatile nitrosamines. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1987;70:554–556.
16. Grebel J. E., Young C. C., Suffet I.H. Solid-phase microextraction of N-nitrosamines. *Journal of Chromatography A*. 2006;1117(1):11–18. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.044.
17. Roux J. L., Gallard H., Croue J. P., Papot S., Deborde M. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science and Technology*. 2012;46(20):11095–11103. DOI: 10.1021/es3023094.
18. Li W., Chen N., Zhao Y., Guo W., Muhammd N., Zhu Y., Huang Z. Online coupling of tandem liquid-phase extraction with HPLC-UV for the determination of trace N-nitrosamines in food products. *Analytical Methods*. 2018;10:1733–1739. DOI: 10.1039/C8AY00014J.
19. Al-Kaseem M., Al-Assaf Z., Karabeet F., A rapid validated RP-HPLC method for the determination of seven volatile N-nitrosamines in meat. *Pharmacology and pharmacy*. 2014;5:298–308. DOI: 10.4236/pp.2014.53037.
20. Cowley E. G., Partington J. R. Dielectric polarization. The dipole moments of some nitrosoamines, p-nitrosophenol, ethylaniline, hydrazobenzene and benzaldehyde phenylhydrazone. *Journal of the Chemical Society*. 1933:1255–1257.
21. Fiddler W. The occurrence and determination of N-nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1975;3(31):352–360. DOI: 10.1016/0041-008X(75)90256-2.
22. Telling G. The determination of N-nitrosamines in foods and cosmetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1982;1:277–280.
23. Eisenbrand G., Preussmann R. A new method for the colorimetric determination of nitrosamines after cleavage of the N-nitroso-group with hydrogen bromide in glacial acetic acid. *Arzneimittel-forschung*. 1970;10(20):1512–1517.
24. Ceh L., Ender F. A sensitive method for the colorimetric determination of volatile nitrosamines in food products and air. *Food and cosmetics toxicology*. 1978;2(16):117–121.
25. Roback S.L., Kodamatani H., Fujioka T., Plumlee M.H. Validation of a novel direct-injection chemiluminescence-based method for N-nitrosamine analysis in advanced-treated recycled water, drinking water, and wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2020; 4(6): 1106–1115. DOI: 10.1039/C9EW00943D.

Сокращение незапланированных простоев с ПО Smart Alerts

Узнайте, чем основанная на условиях диагностика оборудования может быть полезна вашей лаборатории



Регулярное техническое обслуживание оборудования играет значимую роль в поддержании высоких характеристик прибора, а также в снижении продолжительности дорого обходящихся незапланированных простоев. Многие факторы, такие как высокий пробопоток, многосменная работа, сложные условия эксплуатации, могут привести к тому, что прибору будет не хватать технического обслуживания через базовые, рекомендованные производителем периоды времени. Следить за всем этим не так просто, в особенности если приборов в вашей лаборатории немало.

Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

Представляем вам основанный на загрузке подход к техническому обслуживанию оборудования

Современное оборудование может обеспечить пользователя множеством данных о своей работе. Эти данные позволяют ПО Agilent CrossLab Smart Alerts следить за интенсивностью использования всего вашего оборудования и на основе нашего тридцатилетнего практического опыта и долговременной оценки загруженности прибора в различных условиях эксплуатации вовремя предупреждать о необходимости выполнить техническое обслуживание. Smart Alerts показывает пользователю уведомления о необходимости проведения технического обслуживания, когда продолжительность работы прибора или количество выполненных им анализов приближается к установленным Agilent рекомендованным пределам.



Ваш первый шаг к сетевой лаборатории без подключения к интернету

Программу Smart Alerts можно установить на любой компьютер в лаборатории. Так как для нее не требуется интернет-подключение, это безопасный первый шаг к превращению вашей лаборатории в сетевую.

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=hdac5trtkb73ae013ofk4g8nrv1>)

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 выданных 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: 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 используются 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, написание 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 самостоительно 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. Недопустимо 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 подписью на русском и английском языках. В подписях не должно быть аббревиатур. Внутрисуточные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подписей рисунков 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.



ООО «ТД «ХИММЕД» стал официальным дистрибьютором компании Weisstechnik

Weisstechnik – это один из ведущих мировых производителей **климатического оборудования**. Продукция компании включает системы климатического моделирования, теплотехнику, чистые комнаты, системы кондиционирования и многое другое. Отдельное внимание уделяется камерам для испытания стабильности в фармакологической индустрии, которые доступны для заказа в **ООО «ТД «ХИММЕД»**.

Каждая камера создается под требования клиента. Стандартная высота корпуса составляет 2700 мм, однако возможны отклонения. Отсутствие жёсткой привязки к размерам позволяет адаптировать габариты к конструкции помещения. Также возможно сделать камеру пригодной для транспортировки.

Корпус сделан из полиуретана с металлическим покрытием. Он не содержит фреона и легко очищается. Входная дверь оснащена системой экстренного открывания, смотровым окном и нагревателем, который предотвращает образование конденсата при работе в условиях повышенной влажности.

Стандартная комплектация включает всё необходимое оборудование – систему контроля температуры, холодильную установку с воздушным охлаждением, потолочный испаритель со встроенным нагревателем, вентиляторы для циркуляции воздуха и датчики мониторинга температуры и влажности. *Также в комплект входят системы температурной защиты и защиты от избыточной влажности.*

При необходимости комплектация изменяется или расширяется под индивидуальные требования. Например, можно заменить воздушное охлаждение на водяное, установить устройство деминерализации, заменить ультразвуковой увлажнитель на паровой, расширить диапазон температур или установить системы удаленного оповещения. Всё это помогает создать камеру, подходящую для конкретных условий испытания.



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутagenность, репродуктивная токсичность, 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

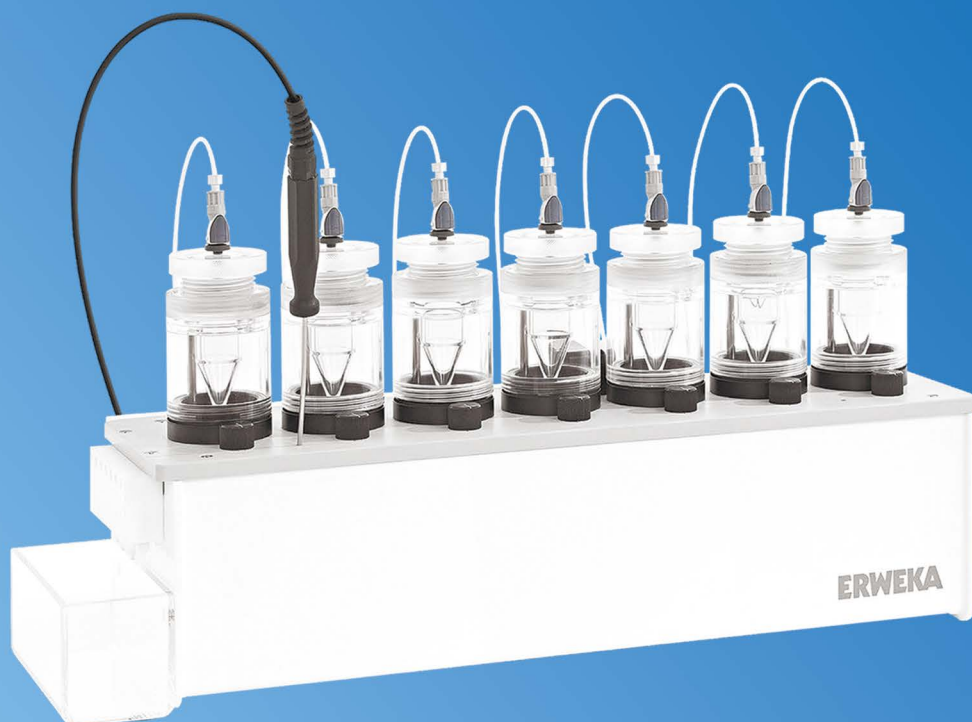
- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

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

Тестер растворения «Проточная ячейка» Erweka DFZ II



Ячейка для
таблеток 12 мм



Ячейка для
таблеток 22,6 мм



Ячейка
для порошков
и гранулятов



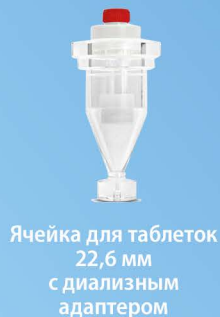
Ячейка
для имплантов



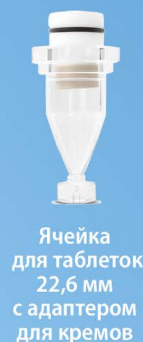
Ячейка
для суппозиториев



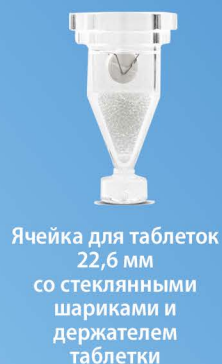
Ячейка
для стентов



Ячейка для таблеток
22,6 мм
с диализным
адаптером



Ячейка
для таблеток
22,6 мм
с адаптером
для кремов



Ячейка для таблеток
22,6 мм
со стеклянными
шариками и
держателем
таблетки



Ячейка для таблеток
22,6 мм
со стеклянной
дробью и
без держателя
таблетки