WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

ГИЛС и НП

ХИММЕД

Полная автоматизация ИФА для контроля остаточного количества белка клеточной линии CHO

Стр. 25

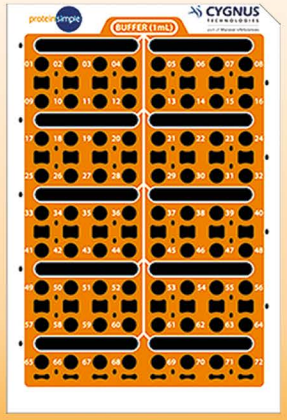
От пробы до результата ИФА – 75 минут

Отсканируйте штрих-код

Добавьте образцы

Запустите анализ

Картридж для анализа CHO-HCP. 72 образца за один запуск



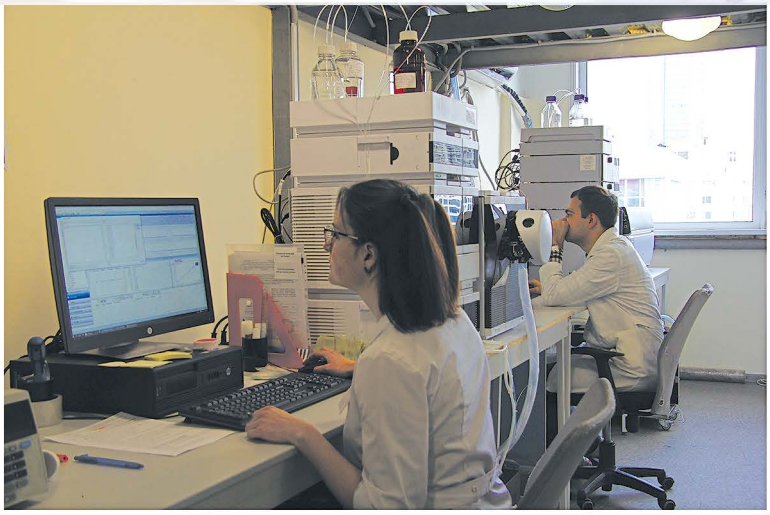
+7(499) 682 65 55
promo@chimmed.ru
www.chimmed.ru

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

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, нанопрепаратов 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 СТКР (сравнительного теста кинетики растворения)

GLP сертификат

ISO сертификат

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 СТКР (сравнительного теста кинетики растворения), определение противолекарственных антител к биологическим лекарственным препаратам.

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2021. Том 10, № 1

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2021. Volume 10, No. 1

Цели и задачи журнала

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

Потанина О. Г., д. фарм. н., директор центра научных исследований и разработок ЦКП (НОЦ) РУДН, 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 технологи 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, Тблисии, 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 технологи ФГАОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

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

Учредители печатной версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3 **Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)** Адрес: 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации** Адрес: 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
Учредители онлайн версии	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Издатель	**Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»)** Адрес: 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 3
Директор журнала	Кульджанова Н. В.
Заведующий редакцией	Михайлова Н. С.
Основан	Журнал издается с ноября 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, 2021
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. Vartaniants, Prof., Cand. of Sci, Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany

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

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

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

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

Elena I. Kalenikova, Prof., Dr. of Sci., Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

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

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

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

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

Evgeny S. Melnikov, Cand. of Sci. (Pharm.), FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

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

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

Olga G. Potanina, Dr. of Sci. (Pharm.), Director of the Shared Research and Educational Center of the Peoples' Friendship University of Russia (SREC PFUR), 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, Moscowskiy 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
Journal director	Natalia V. Kuldjanova
Managing Editor	Nadezhda S. Mikhaylova
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, 2021
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 16

Мероприятия 27

Поиск и разработка новых лекарственных средств

PD-L1 как потенциальная мишень в противораковой терапии (обзор)
Н. Н. Андрусова, М. А. Колганова, А. В. Алешина, И. Е. Шохин 31

Фармацевтическая технология

Подходы к разработке препарата низкодозированного налтрексона в форме спрея назального (обзор)
Ю. М. Домнина, В. В. Суслов, С. А. Кедик, П. О. Волкова 37

Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолина) как носители для трансбуккальной доставки метформина
А. С. Викторова, Е. С. Елизарова, Р. С. Романова, В. Р. Тимергалиева, В. В. Хуторянский, Р. И. Мустафин 48

Системы доставки офтальмологических препаратов (обзор)
Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, Н. Б. Демина, И. В. Лапик, А. Р. Тураева, И. И. Краснюк 57

Влияние растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства субстанций дарунавира и дарунавира этанолата
С. А. Золотов, И. А. Даин, Н. Б. Демина, А. С. Золотова, Е. С. Пономарев 67

Методы анализа лекарственных средств

Разработка параметров стандартизации сырья ряски малой (*Lemna minor* L.)
Л. Н. Никифоров, С. В. Кривощеков, Н. Э. Коломиец, Т. В. Кадырова, Н. В. Исайкина, Н. Ю. Абрамец, Е. А. Безверхняя, М. В. Белоусов 74

Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.)
В. Г. Лужанин, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, Е. А. Гришукова, И. С. Сулоев, С. Н. Смирнов, Е. Б. Серебряков 83

Использование метода капиллярного электрофореза при определении количественного содержания мангиферина в траве видов рода копеечник (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.) флоры Северного Кавказа
Д. Р. Имачуева, Ф. К. Серебряная 90

Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор)
А. А. Орлова, Й. Стругар, О. Ю. Штарк, В. А. Жуков, В. Г. Лужанин, М. Н. Повыдыш 97

Стандартизация лекарственного препарата «Чемеричная вода», получаемого на основе чемерицы Лобеля (*Veratrum lobelianum* Bernh.), по показателю «Количественное определение»
Е. В. Мельник, М. В. Белова, И. А. Тюрин, Г. В. Раменская 107

Доклинические и клинические исследования

Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша
А. Ю. Медкова, А. А. Лиджиева, Е. Г. Сёмин, Л. Н. Синяшина, Р. А. Сюндюкова, И. Н. Дьяков, Л. В. Колобухина, И. С. Кружкова, Л. Н. Меркулова, М. Г. Русанова, Н. А. Антипят, С. В. Сметанина, Г. И. Каратаев 114

Определение валганцикловира и ганцикловира 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 120

Регуляторные вопросы

Развитие систем переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на предприятиях производства лекарственных средств стран ЕАЭС
В. А. Смирнов, В. В. Горячкин, В. Н. Шестаков, Р. А. Абрамович 130

Методические рекомендации по содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях ЕАЭС через управление вовлеченностью производственного персонала
В. А. Смирнов, В. В. Горячкин, В. Н. Шестаков, Р. А. Абрамович 136

Документирование фармацевтической разработки. Часть 1. Изучение документооборота предприятия
И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова, В. Д. Метелева, Е. В. Флисюк 142

Исправления

Исправление к статье: «Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L.»
С. В. Горяинов, С. Эспарса, В. А. Ивлев, Д. И. Писарев, Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, О. О. Новиков, О. Г. Потанина, С. Лазар, А. В. Хромов, Н. Н. Бойко 149

Некролог 151

CONTENTS

Introduction 10

Practical recommendations 16

Events 27

Research and development of new drug products

PD-L1 as a Potential Target in Cancer Therapy (Review)
Nadezhda N. Andrusova, Maria A. Kolganova, Alexandra V. Aleshina, Igor E. Shohin 31

Pharmaceutical Technology

Approaches to the Development of a Low-dose Naltrexone Preparation in the Form of a Nasal Spray (Review)
Yuliya M. Domnina, Vasiliy V. Suslov, Stanislav A. Kedik, Polina O. Volkova 37

Interpolymer Complexes Based on Carbopol® and Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Carriers for Buccal Delivery of Metformin
Anastasia S. Viktorova, Elizaveta S. Elizarova, Regina S. Romanova, Venera R. Timergalieva, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Rouslan I. Moustafine 48

Ophthalmic Drug Delivery Systems (Review)
Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova, Natalia B. Demina, Ivan V. Lapik, Anastasia R. Turaeva, Ivan I. Krasnuk 57

The Effect of Solvents and Drying Temperature on the Physicochemical Properties of Darunavir and Darunavir Ethanolate Substances
Sergey A. Zolotov, Igor A. Dain, Natalia B. Demina, Anna S. Zolotova, Evgeny S. Ponomarev 67

Analytical Methods

Development of Parameters for Standardization of Duckweed (*Lemna Minor* L.) Raw Material
Leonid N. Nikiforov, Sergei V. Krivoshchekov, Natalia E. Kolomiets, Tatyana V. Kadyrova, Nadezhda V. Isaikina, Natalia Y. Abramets, Ekaterina A. Bezverkhniaia, Mikhail V. Belousov 74

Isolation of Individual Compounds from the Terrestrial Parts of *Ononis Arvensis* L. and *Solidago Canadensis* L.
Vladimir G. Luzhanin, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Ekaterina A. Grishukova, Ivan S. Suloev, Sergey N. Smirnov, Evgeny B. Serebryakov 83

Use of Capillary Electrophoresis Method in Determination of Quantitative Content of Mangiferin in Grass of Species of Genus Hedysarum (*Hedysarum Caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum Grandiflorum* Pall., *Hedysarum Daghestanicum* Rupr. ex Boiss) of flora of the North Caucasus
Dzhavgarat R. Imachueva, Fatima K. Serebryanaya 90

Use of Metabolomic Approaches in Analysis of Medicinal Plants and Phytopreparations (Review)
Anastasiia A. Orlova, Jovana Strugar, Oksana Yu. Shtark, Vladimir A. Zhukov, Vladimir G. Luzhanin, Maria N. Povydysh 97

Quantitative Content Parameter in the Standardization of Veratrum Aqua, *Veratrum Lobelianum* Bernh. Based Drug
Elizaveta V. Melnik, Maria V. Belova, Igor A. Tyurin, Galina V. Ramenskaya 107

Preclinical and clinical study

A Clinical Study of the Safety and Tolerability of Live Nasal Vaccines for the Prevention of Pertussis
Alisa Yu. Medkova, Alevtina A. Lidzhieva, Evgenij G. Semin, Lyudmila N. Sinyashina, Rezida A. Sioundioukova, Ilya N. Dyakov, Ludmila V. Kolobukhina, Irina S. Kruzhkova, Liliya N. Merkulova, Marina G. Rusanova, Natalia A. Antipyat, Svetlana V. Smetanina, Gennadij I. Karataev 114

Development and Validation of Valganciclovir and its Active Metabolite Ganciclovir 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 120

Regulatory Issues

Development of Retraining Systems for the Implementation of the Pharmaceutical Quality System at Pharmaceutical Production Enterprises of the EAEU Countries
Vladimir A. Smirnov, Vyacheslav V. Goryachkin, Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich 130

Guidelines for Promoting the Implementation of Pharmaceutical Quality Systems at EAEU Enterprises Through the Management of the Engagement of Production Personnel
Vladimir A. Smirnov, Vyacheslav V. Goryachkin, Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich 136

Documentation of Pharmaceutical Development. Part 1. Study of the Documentation of the Site
Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova, Valeria D. Meteleva, Elena V. Flisyuk 142

Erratums

Erratum: "A Technology for Isolation and Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Biologically Active Components from *N. sativa* L. Seeds"
Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Oleg O. Novikov, Olga G. Potanina, Simon Lazar, Arkidiy V. Khromov, Nikolay N. Boyko 149

Obituary 151

Научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19»

Научно-практическая конференция «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19» прошла 11 декабря 2020.

Ежегодная научно-практическая конференция, традиционно организуемая ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственным журналом «Разработка и регистрация лекарственных средств», прошла 11 декабря. В этот раз конференция впервые была организована в формате онлайн. Организаторы и слушатели отметили, что изменившийся формат мероприятия не отразился на качестве и актуальности представленных докладов и обсуждаемых тем.

Мероприятие посетило порядка 100 слушателей.

В рамках конференции «Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19» мы поговорили об актуальных аспектах разработки, а также доклинических и клинических исследований оригинальных, воспроизведенных, гибридных и биоаналогичных лекарственных средств, включая препараты, актуальные в условиях пандемии коронавирусной инфекции.

Открывала конференцию **секция «Контроль качества на фармацевтическом производстве»**.

В рамках данной секции представитель немецкого концерна Sartorius **Глеб Барсуков** поделился решениями компании для *Тестирования, Валидации и Контроля качества исследований на всех этапах от исследования/разработки до промышленного Upstream и Downstream и контроля качества на фармацевтическом производстве*.

Основные сферы активности концерна в области биопроцессов – это одноразовые технологии, фильтрация, ферментация, культивирование клеточных культур, очистка, сервисное обслуживание. Сегмент «Лабораторное оборудование» предлагает решения для лабораторий и научно-исследовательских институтов в направлении обеспечения качества в сфере фармацевтики и биофармацевтики.

Так, для микробиологического контроля качества были рассмотрены следующие решения:

- Определение микоплазм. Быстрый анализ на микоплазму за 3 часа методом RT-PCR (вместо 28 дней).
- Определение ОМЧ. «Бескасательный» перенос мембраны на агар. Система Microsart.
- Быстрые бактериальные тесты. Быстрый анализ на все бактерии, дрожжи, плесень за 3 часа методом RT-PCR (вместо 28 дней).

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ЦФА | центр фармацевтической аналитики

Программа конференции
"Разработка и регистрация лекарственных средств. Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19"

Конференция состоится 11 декабря 2020 года с 10:30 до 16:00 по московскому времени в онлайн-формате на платформе Zoom

10:30 – 10:40	**Открытие конференции**
	Наталья Кульджанова (Разработка и регистрация лекарственных средств)
10:40 – 12:00	**Секция «Контроль качества на фармацевтическом производстве»**
	Модератор – **Наталья Кульджанова**. Время доклада – 25–30 мин **Глеб Барсуков (Сарториус).** Решения Sartorius для Life Science Research и контроля качества в фармацевтическом производстве **Михаил Чистяков (Аврора).** Новейший широкополосный настольный ЯМР-спектрометр X-Pulse от Oxford Instruments, как универсальный инструмент для контроля подлинности, дозирования и строения фармсубстанций в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15, а также изучения кинетики. В рамках выступления предусмотрено проведение демонстрационных измерений на приборе X-Pulse напрямую из лаборатории Oxford Instruments **Михаил Демин (USP/Химмед).** Значимость использования фармакопейных стандартов: о неопределенности результатов, предельных допусках и вторичных стандартах
12:00 – 13:00	**Секция «Исследования биотехнологических лекарственных средств»**
	Модератор – **Игорь Шохин**. Время доклада – 30 мин **Дмитрий Рождественский (Евразийская экономическая комиссия).** Требования Евразийского экономического союза к фармакологической разработке биологических лекарственных средств на основе моноклональных антител **Дмитрий Фармаковский (Shimadzu).** Решения для исследования иммуноглобулинов методами хроматомасс-спектрометрии
13:00 – 14:30	**Секция «Исследование препаратов в условиях пандемии COVID-19»**
	Модератор – **Игорь Шохин**. Время доклада – 30 мин **Игорь Шохин (ООО «ЦФА»).** Опыт исследований Центра Фармацевтической Аналитики в условиях пандемии: ЦФА vs COVID и не только **Константин Захаров (НИЦ «ЭкоБезопасность»).** Организация работы исследовательского центра в период пандемии COVID-19 **Владимир Попов (Клиническая больница «РЖД-Медицина» имени Н. А. Семашко).** Особенности проведения клинических испытаний лекарственных средств для лечения COVID-19
14:30 – 16:00	**Секция ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС в исследованиях лекарственных средств**
	Модератор – **Тимофей Комаров**. Время доклада/дискуссии – 20 мин **Ольга Арчакова (ООО «ЦФА»).** Биоаналитические аспекты изучения лекарственных средств с неустановленной фармакокинетикой и метаболизмом **Тимофей Комаров (ООО «ЦФА»).** Фатальные ошибки на различных этапах проведения исследований биоэквивалентности **Евгений Мельников, Татьяна Родина (ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России, ГБУЗ ГКБ им. И. В. Давыдовского).** Практический опыт решения проблем при проведении исследований методом ВЭЖХ-МС в биоаналитике **Евгений Панихин (Shimadzu).** Определение генотоксичных примесей в лекарственных средствах методами хроматомасс-спектрометрии
16:00	**Дискуссия, подведение итогов**

При поддержке

ERWEKA ХИММЕД SARTORIUS Agilent Trusted Answers АВРОРА ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ

Программа научно-практической конференции

Scientific and practical conference program

- Тест на стерильность. Проба стерильна? Да-Нет. Система Sterisart.
- Мониторинг воздуха. 8-часовой непрерывный мониторинг чистых помещений.

Также мы узнали о решениях для пробоподготовки для аналитического контроля качества:

- Аналитические весы Cubis® II и Secura®.
- Ультрачистая вода, серия arium® mini – до 15 литров в день воды с высокой очисткой от TOC, эндотоксинов ДНКаз, РНКаз.
- Механические дозаторы Tacta®.
- Электронные дозаторы Picus® NxT.
- Пробоподготовка фильтрацией, очистка добавок, буферов, реагентов, газов.
- Шприцевые фильтры Minisart.

В своем следующем докладе **Михаил Чистяков**, (ООО «АВРОРА») совместно с коллегой **Александром Сагидулиным** (Oxford Instruments) рассказали о *применении новейшего широкополосного настольного ЯМР-спектрометра X-Pulse от Oxford Instruments для контроля подлинности, дозирования и строения фармсубстанций* в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15, а также изучения кинетики.

Компания Oxford Instruments представила семейство спектрометров Pulsar и пришедший им на смену первый в мире широкополосный настольный ЯМР-спектрометр высокого разрешения X-Pulse. Компания поставила перед собой задачу сделать ЯМР-спектрометр таким же доступным и простым в использовании, как обыкновенный ИК-Фурье-спектрометр, имеющийся практически в каждой фармацевтической лаборатории (подробнее см. стр. 16).

Спектрометр X-PULSE стал своего рода технологическим прорывом в области настольного инструментального обеспечения метода ЯМР. Спектрометр обладает высоким разрешением (0,3 Гц, 0,005 ppm) и чувствительностью (SNR 200:1 пик к пику) (рисунок 2), хорошей стабильностью, узкой формой линий благодаря надежной термостабилизации магнита, а также всем необходимым функционалом для записи спектров не только на протонах (^{1}H), ядрах фтора (^{19}F) и углерода (^{13}C), но и ядрах фосфора (^{31}P), натрия (^{23}Na), лития (^{7}Li), бора (^{11}B), кремния (^{29}Si). X-PULSE позволяет проводить не только 1D-эксперименты ^{1}H 1D, ^{19}F 1D, эксперименты 1D с подавлением одного и двух растворителей, 1D-эксперименты на ядрах ^{13}C, ^{31}P, ^{7}Li, ^{23}Na, ^{29}Si, ^{11}B, DEPT (45, 90, 135), T1 (инверсия-восстановление), T2 (CPMG), TOCSY, PFGSE, 1D NOE, но и разнообразные 2D-эксперименты: COSY 45, HF COSY, DQF COSY, TOCSY, NOESY, HSQC ME, HMBC, в том числе и заданием градиентов, HETCOR, 2D J Resolved.

Программное обеспечение позволяет самостоятельно программировать эксперименты, задавать импульсные последовательности и градиенты. Кроме того, теперь есть возможность самостоятельно проводить эксперименты при различных температурах в диапазоне 20–60 °C с использованием ячейки переменных температур, изучать кинетику реакций в реальном времени с использованием проточной ячейки (рисунок 1).

Использование автосамплера позволит автоматизировать экспериментальный процесс при большом потоке проб. Особенность прибора такова, что, приобретая базовую модель, в дальнейшем вы сможете

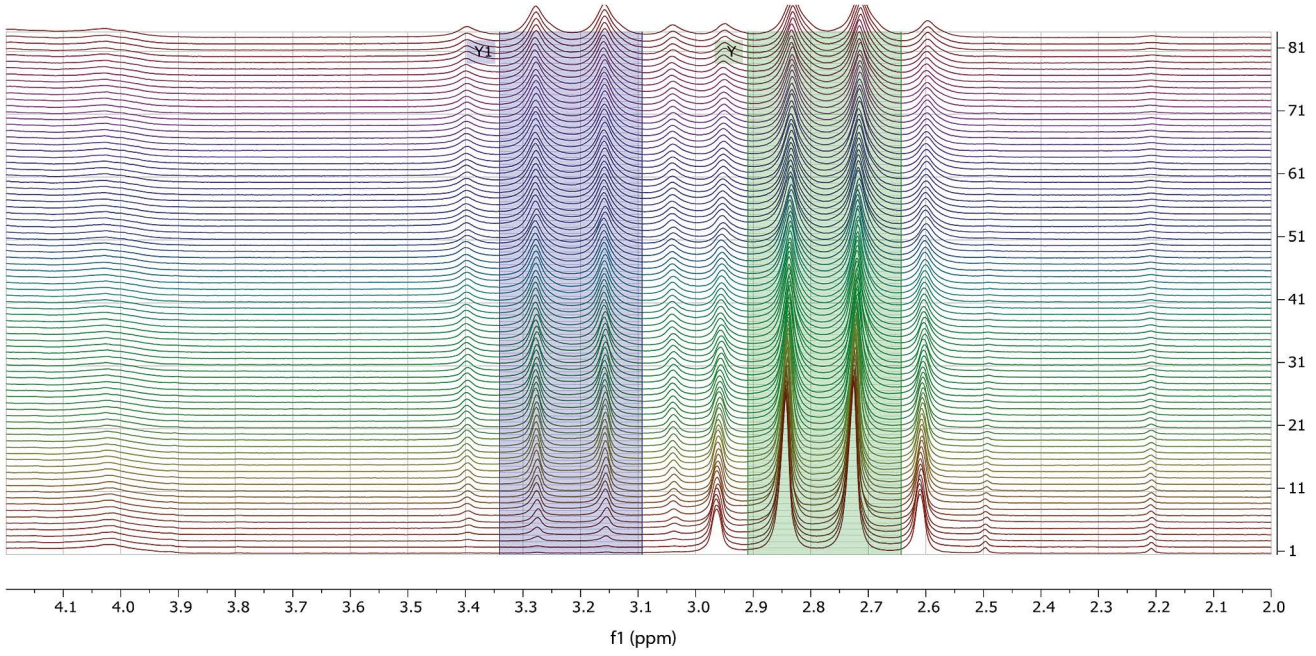


Рисунок 1. Реакция этерификации. Протонные спектры реагентов и продуктов, записанные через заданные интервалы времени

Figure 1. The esterification reaction. Proton spectra of reagents and products recorded at specified time intervals

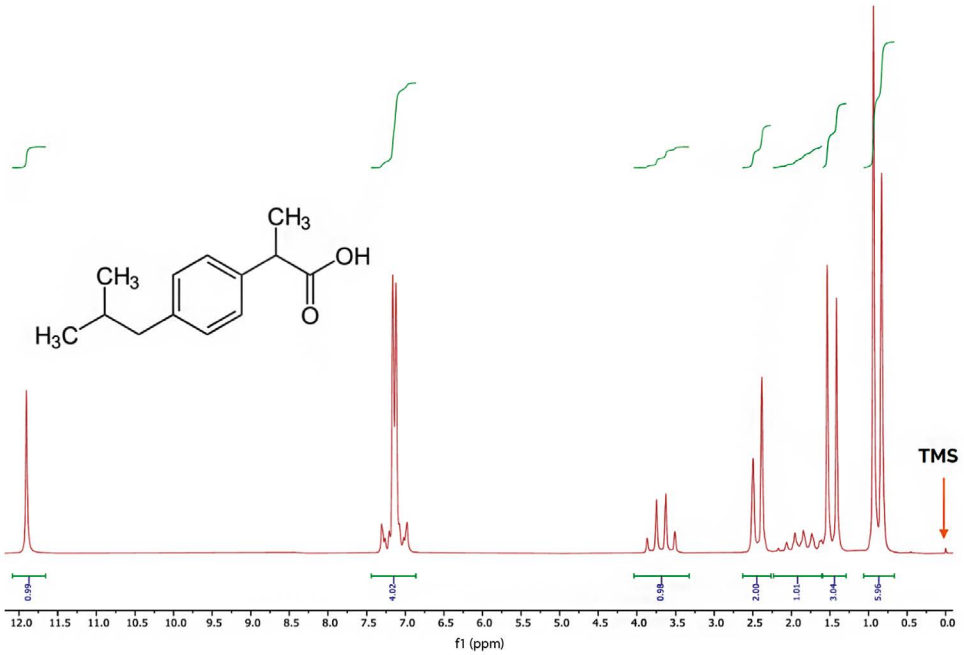


Рисунок 2. Протонный спектр ибупрофена 50 мМ в дейтерированном хлороформе, 4 скана

Figure 2. Proton spectrum of ibuprofen 50 mM in deuterated chloroform, 4 scans

дооснастить ее всем необходимым в зависимости от сложности решаемых задач.

Важным с практической точки зрения является и тот факт, что измерительная ячейка в спектрометре X-PULSE легко извлекается из магнита и разбирается для обслуживания. Для начала работы достаточно установить ячейку обратно в магнит и отшимировать прибор. Это позволяет вам просто и быстро устранять последствия попадания пробы из разбитой ампулы или иных инородных тел внутрь ячейки. Для работы необходимы обычные 7-или 8-дюймовые 5-миллиметровые ЯМР-пробирки.

О значимости использования фармакопейных стандартов, о погрешностях результатов, защитных диапазонах и вторичных стандартных веществах, мы поговорили с представителем Фармакопеи США (USP) **Михаилом Деминым**.

Многие пользователи стандартных образцов считают вторичные стандартные образцы качественной альтернативой фармакопейным стандартам. Однако ввиду ряда особенностей изготовления вторичных стандартных веществ фактическое их применение при выполнении аналитических методик из фармакопейных монографий может поставить под сомнение полученные результаты. Даже с учетом наиточнейшего выполнения самого аналитического процесса итоговый результат, полученный при использовании вторичного образца, может быть вне границ допустимого диапазона значений.

Данные исследования с применением математической модели расчета возможного диапазона погрешностей наглядно показали, что даже при выполнении простой аналитической процедуры с использованием вторичного стандартного вещества полученная погрешность на 20 % превышала результат, полученный при использовании комбинации документального и вещественного фармакопейных стандартов.

Таким образом, результаты проведенного исследования наглядно подчеркивают необходимость соблюдения связки фармакопейных стандартов – монографии и стандартного вещества. В случае практического нарушения данной комбинации полученные результаты могут быть либо некорректны, либо интерпретированы как неприемлемые даже в случае точного выполнения аналитической методики.

В рамках *секции «ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС в исследованиях лекарственных средств»* было представлено 4 доклада.

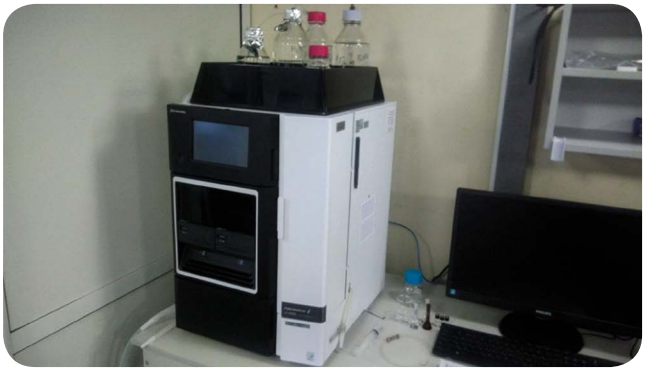
Открывал секцию доклад **Ольги Арчаковой**, старшего химика-аналитика ООО «ЦФА», на тему *«Биоаналитические аспекты изучения лекарственных средств с неустановленной фармакокинетикой и метаболизмом»*. Данный вопрос является особо актуальным в связи с необходимостью приведения регистрационных досье на лекарственные средства с неустановленной фармакокинетикой в соответствие с требованиями ЕАЭС до 31.12.2025. Доклад был ярко проиллюстрирован двумя примерами из практической деятельности ЦФА.

Продолжил выступление коллеги **Тимофей Комаров**, заведующий лабораторией биоаналитических исследований № 2 ООО «ЦФА», с докладом на тему *«Фатальные ошибки на различных этапах проведения исследований биоэквивалентности»*. В докладе были представлены примеры, иллюстрирующие ошибки,

Контроль качества в производственном процессе

Quality control in the production process

приводящие к искажению результатов исследований биоэквивалентности, такие как некорректный выбор биологической матрицы, выбор аналитического оборудования, недостоверные и противоречащие друг другу данные научных публикаций по теме исследования, пренебрежение аналитиком-хроматографистом принципами хроматографического разделения и применение так называемой мёртвообъёмной хроматографии, приводящей к получению ложных результатов, вопросы специфичности биоаналитических методик.



В следующем докладе на тему *«Практический опыт решения проблем при проведении исследований методом ВЭЖХ-МС в биоаналитике»* **Евгений Мельников** и **Татьяна Родина**, представители ГКБ им. И. В. Давыдовского и ЦКФ ФГБУ НЦЭСМП, представили своё видение отдельных практических аспектов при проведении валидационного и аналитического этапов фармакокинетических исследований, а также поделились собственным опытом по данному вопросу.

Закрывал секцию доклад **Евгения Панихина**, технического консультанта московского представительства «Шимадзу Европа ГмбХ», на тему *«Определение генотоксичных примесей в лекарственных средствах методами хромато-масс-спектрометрии»*. В докладе были представлены аналитические решения, предлагаемые компанией «Шимадзу», для определения нитрозаминов в лекарственных субстанциях и препаратах. Доклад сопровождался примерами готовых решений и их практического воплощения.

Все доклады вызвали широкую дискуссию в форме ответов на вопросы слушателей и диалога слушателей с докладчиком.

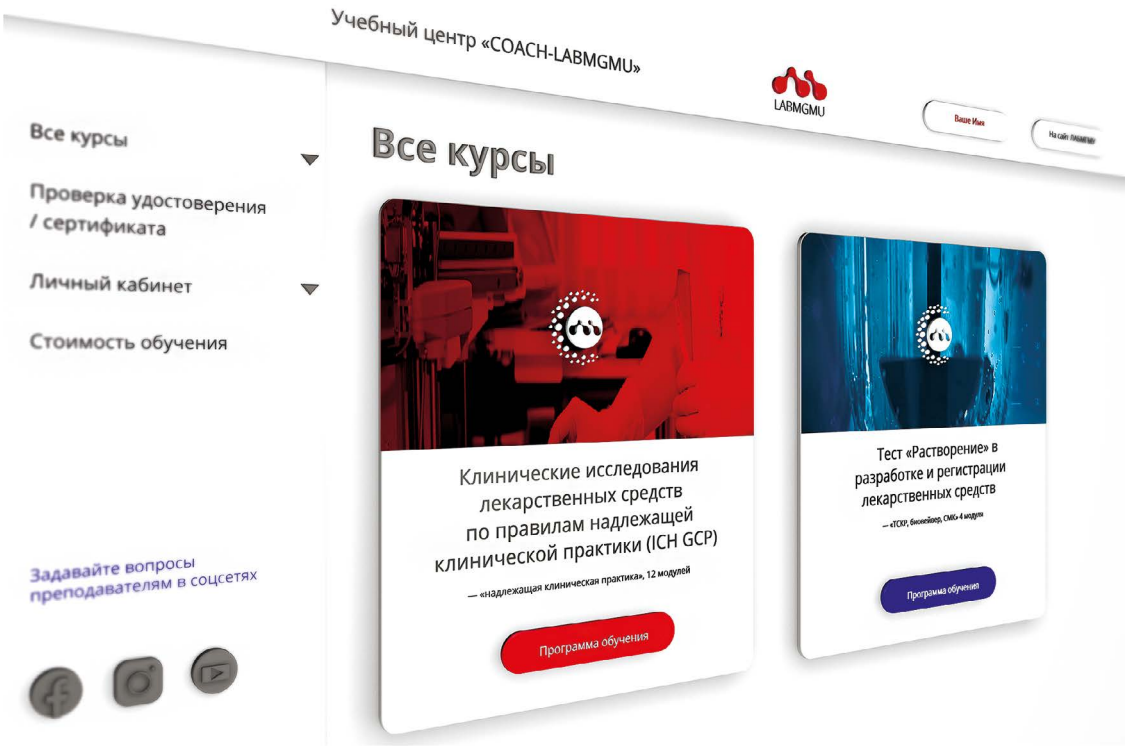
Мероприятие прошло при поддержке наших партнеров ERWEKA, Химмед, SARTORIUS, Agilent, АВРОРА.

Благодарим спикеров за интересные доклады, актуальные тематики и уделенное время!

Для получения записи мероприятия, а также в случае наличия вопросов к спикерам Вы можете отправить запрос на электронную почту info@pharmjournal.ru.

Приходите к нам учиться

Контрактно-исследовательской организацией ЛАБМГМУ открыт лицензированный образовательный ресурс (https://coach.labmgmu.ru), который дает возможность пройти онлайн-курс обучения, чтобы повысить свою квалификацию в сфере обращения лекарственных средств.



О возможностях и преференциях, которые предоставляются слушателям на новом ресурсе, рассказывает руководитель учебного центра и отдела по обеспечению и контролю качества ЛАБМГМУ кандидат медицинских наук Виктория Артюх.

– Виктория Валерьевна, что послужило предпосылкой создания такого обучающего ресурса? Ведь фармацевтические факультеты медицинских российских учебных заведений выпускают немало специалистов в области разработки, исследований и производства лекарственных препаратов.

– Организуя проведение клинических исследований в медицинских учреждениях по всей России, команда ЛАБМГМУ столкнулась с тем, что у врачей, которые планируют принимать участие в клинических исследованиях или уже являются врачами-исследователями, практически нет возможности проходить курсы повышения квалификации у себя в регионах. Большинству врачей трудно найти время на учебу в Москве или Санкт-Петербурге, особенно в наши непростые времена. А без удостоверения о прохождении курсов повышения квалификации по GCP заниматься клиническими исследованиями запрещено законодательством. В наше время все меняется быстро, а иногда и просто стремительно, поэтому необходимо быть постоянно в курсе новых разработок, изменений в нормативных документах, инструкциях и требованиях. Без этого просто невозможно качественно выполнять свою работу.

Мы считаем, что высокий уровень подготовки и квалификация людей, которые занимаются таким важным и ответственным делом, как испытание новых лекарственных средств, очень важен. Поэтому мы организовали учебные курсы для исследователей. К слову сказать, на сегодняшний день ресурсы, предлагающие удаленное обучение в сфере обращения лекарственных средств, часто лицензии на образовательную деятельность не имеют. А у нас такая лицензия есть. Поэтому удостоверения и сертификаты, выданные после прохождения учебного курса образовательного ресурса ЛАБМГМУ, в соответствии с ФЗ № 273-ФЗ от 29.12.2012 «Об образовании в Российской Федерации» являются официальными документами об образовании. Факт прохождения слушателем учебного курса ЛАБМГМУ и подлинность его сертификата можно легко проверить на нашем же ресурсе в электронном реестре выданных документов.

– На кого рассчитан ваш курс?

– Это широкий круг специалистов, которые работают в сфере обращения лекарственных средств, от разработки и исследований до производства и мониторинга безопасности препаратов. Это не только медицинский персонал, фармацевты и провизоры, но и химики, биологи, физики, которые участвуют в клинических исследованиях со стороны исследовательского центра, контрактно-исследовательских организаций, а также со стороны производителя и держателя регистрационных удостоверений лекарственных препаратов. После прохождения учебного курса они получают «Удостоверение о прохождении курса повышения квалификации по GCP», которое дает право работать в области клинических исследований лекарственных средств.

В то же время наши курсы могут проходить и люди, не имеющие профильного образования. Тогда они получат сертификат о прохождении обучения, но уже без права заниматься непосредственно клиническими исследованиями.

– Какие курсы представлены на вашем ресурсе?

– Уже запущен курс «Клинические исследования лекарственных средств по правилам надлежащей клинической практики (ICH GCP)». Его подготовила наша команда, в которую входят выпускники Первого МГМУ имени М. И. Сеченова, других ведущих медицинских вузов России. Мы более 15 лет специализируемся на проведении и организации клинических и доклинических исследований лекарственных препаратов и биологически активных добавок, регистрации лекарственных средств. Наши специалисты имеют в этой области большой опыт, на основании которого и был составлен учебный курс. Прошедшие его получают официальный документ о ДПО «Удостоверение о прохождении повышения квалификации по GCP».

Не меньший интерес представляет и другой наш курс «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств», который подготовил коллектив GLP/ISO-9001-сертифицированной лаборатории ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» под руководством доктора фармацевтических наук, профессора **Игоря Евгеньевича Шохина**.

Как известно, в подавляющем большинстве случаев причиной неудач в исследовании биоэквивалентности дженерика является неэквивалентность кинетики растворения препаратов. Поэтому крайне важно провести данное исследование (ТСКР) на надлежащем уровне. На курсах рассмотрены ключевые вопросы, связанные с тестом «Растворение»: оборудование и его квалификация, разработка и валидация методик, применение теста «Растворение» в контроле качества и оценке эквивалентности лекарственных средств, моделирование физиологическких условий при проведении испытания, требования к процедуре «биовейвер» по ЕАЭС, система менеджмента качества лабораторий и многие другие. Курс 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.

Игорь Евгеньевич Шохин

– С момента открытия ваших онлайн-курсов прошло не очень много времени. Но уже видно, что они пользуются популярностью. Вы будете продолжать этот проект?

– Конечно. Сразу, как вышел в свет наш курс по GCP, мы поняли, что потребность в онлайн-образовании сейчас очень высока, а информация, которая в нем изложена, очень востребованна.

Хочу еще раз обратить внимание, что специалисту из региона иной раз трудно поехать в другой город на учебу. А удостоверение о прохождении им курса повышения квалификации надо постоянно обновлять. И хотя в нашем законодательстве такого требования нет, аудиторы и представители фармацевтических компаний, проводящие клинические исследования, рекомендуют исследователям актуализировать свои знания по GCP, повышая квалификацию каждые 2–3 года. У некоторых компаний срок обновления по GCP даже сокращен до 1 года. И наш учебный курс, который по мере необходимости будет дополняться новыми сведениями, дает возможность сделать это бесплатно и в режиме онлайн.

Для специалистов, работающих на фармацевтических производственных предприятиях, разработан курс «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств». Сейчас мы готовим учебный курс, посвященный высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Уверена, что нашим коллегам-производственникам это будет интересно.

Рекламный материал/Advertising material

Возможности низкопольных спектрометров ЯМР в скрининге содержания лекарственных субстанций

Г. А. Калабин[1], В. Г. Васильев[1], В. А. Ивлев[1]

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

Possibilities of low-field NMR spectrometers in screening the content of medicinal substances

Gennadiy A. Kalabin[1], Vasiliy G. Vasil'ev[1], Vasiliy A. Ivlev[1]

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

Предложено применение современных низкопольных спектрометров ЯМР ^{1}H на рабочей частоте 60 МГц для контроля подлинности лекарственных средств. Проведена апробация фурье-спектрометра ЯМР Pulsar компании Oxford Instruments (Великобритания) в качестве инструмента для идентификации и количественного анализа ряда лекарственных средств (ЛС). Показано, что спектры ЯМР ^{1}H на рабочей частоте 60 МГц позволяют идентифицировать в ЛС лекарственные субстанции, а по выделенным обособленным индикаторным сигналам определять их количественное содержание без использования стандартных образцов. Для валидации и верификации разрабатываемых методик бесстандартного скрининга рекомендовано использование тандема низкопольной и высокопольной (более 300 МГц для ^{1}H) аппаратуры ЯМР.

Для защиты здоровья потребителей несомненна важность быстрого скрининга лекарственных средств (ЛС), поступающих в аптечную сеть и лечебные учреждения. Для доказательства подлинности и качества ЛС в фармакопейных статьях содержатся валидированные методики с применением стандартных образцов. В отличие от них скрининговые методы должны отвечать следующим требованиям: простота или отсутствие пробоподготовки, быстрая процедура измерения и идентификации интересующих компонентов (обычно лекарственных субстанций), оценка их содержания для оперативного принятия решения [1]. С позиций универсальности, информативности и фундаментальности такими возможностями среди известных методов анализа в наибольшей степени обладает единственный – количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

ПОДБОР ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ СКРИНИНГА

В международной системе СИ спектроскопия ЯМР признана прямым методом определения мольной доли веществ в растворах. Сегодня это общепринятый уникальный метод обнаружения, идентификации строения и определения содержания компонентов сложных смесей, какими являются ЛС. Он широко используется в фармакопеях развитых стран и входит в Государственную фармакопею РФ около 20 лет. Однако его применение в отечественной практике контроля ЛС по состоянию на 2019 год, помимо контроля подлинности стандартных образцов (СО), ограничивается всего двумя фармакопейными статьями, относящимися к анализу гепарина и карбогидратов вакцин. Такое отношение к методу ЯМР можно объяснить высокой стоимостью и жесткими условиями эксплуатации современных высокопольных исследовательских спектрометров ЯМР, которые требуют, в частности, бесперебойного снабжения их криожид-

ЯМР-спектрометр Pulsar компании Oxford Instruments (Великобритания)
В 2019 году Компания Oxford Inst. выпустила усовершенствованную модель ЯМР-спектрометра – X-Pulse

NMR spectrometer Pulsar from Oxford Instruments (UK)
In 2019, Oxford Inst. released an improved model of the NMR spectrometer - X-Pulse

костями (гелий, азот)[1]. Немаловажен и человеческий фактор: из-за недостатков профессиональной подготовки отечественных специалистов-фармацевтов среди них распространены ошибочные представления о сложности регистрации и интерпретации ЯМР-спектров.

После появления в 1960-х первой генерации коммерческих спектрометров ЯМР с резонансными частотами для протонов 40–100 МГц на базе электромагнитов весом несколько тонн и без фурье-преобразования потребовалось около 50 лет для технического ренессанса в производстве нового поколения низкопольного аналитического оборудования ЯМР. Сегодня предлагается несколько серийных моделей фурье-спектрометров с рабочей частотой для ядер ^{1}H 60 МГц, особенность которых – новые компактные и легкие постоянные магниты вместо электромагнитов. Преимущества таких приборов перед высокопольными системами с криомагнитами: отсутствие необходимости в криожидкостях, малые энергопотребление, размер и вес, предельная простота использования, совершенное программное обеспечение и, как следствие, сниженная на порядок и более стоимость. Однако уменьшение резонансной частоты влечет за собой неизбежные последствия: чувствительность уменьшается в несколько десятков раз, а спектры усложняются, поскольку мультиплетные сигналы отдельных протонов перекрываются значительно сильнее. Тем не менее широкие возможности, очевидную эффективность и перспективность нового поколения низкопольного оборудования уже показали примеры их использования для решения учебно-образовательных, научно-прикладных и индустриальных задач в химическом анализе [2–5], мониторинге реакций [6], оценке качества [7], хемометрике на основе корреляций «строение – свойства» и непрерывного контроля процессов в промышленности [8, 9]. В фармацевтической химии также появились единичные публикации, посвященные идентификации наиболее простых по составу лекарственных субстанций [10], выявлению фальсификаций синтетическими компонентами некоторых парафармацевтиков – ингибиторов ФДЭ-5 и средств снижения веса [11], выявлению природы и строения используемых в фармацевтике растительных масел [12]. Во всех случаях использовали методики быстрого скрининга со временами регистрации спектров ЯМР ^{1}H (зависит от концентрации аналита, характера задачи, уровня выявляемых примесей), не превышающими нескольких десятков минут.

Наша научная группа разрабатывает новую методологию фармакопейного анализа на основе сочетания методов спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии (см., например, [13] и ссылки в ней). С начала 2017 года проходит апробацию фурье-спектрометр ЯМР Pulsar компании Oxford Instruments (Великобритания) с рабочей частотой 60 МГц для ^{1}H, обладающий среди приборов такого класса наиболее высокой чувствительностью (S/N > 200 для раствора 1 % этилбензола в хлороформе) и разрешением (лучше 0,5 Гц). Близкие характеристики имеет настольный ЯМР-спектрометр Spinsolve компании Magritek, характеристики которого подробно описаны в [14]. Спектрометр Pulsar укомплектован мультиядерным датчиком ^{1}H, ^{19}F, ^{13}C, может работать в режиме двумерных гомо- и гетероядерных экспериментов, использует стандартные ампулы для ЯМР диаметром 5 мм, имеет пакет программного обеспечения Mnova NMR от MestreLab. Проведена оценка его возможностей по идентификации и количественному анализу различных гипертензивных ЛС, антибиотиков, олигопептидных препаратов, флавоногликозидов, исследованных ранее на высокопольном исследовательском оборудовании с рабочими частотами 400 и 600 МГц. В представленной работе в качестве объектов быстрого скрининга рассмотрено несколько популярных коммерческих антибиотиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все анализируемые ЛС приобретены в аптечных сетях.

Левофлоксацин (I) – синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, левовращающий изомер. Химическое название: (±)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7H-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота, гемигидрат. Брутто-формула: $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, M = 361,4 г/моль. Структурная формула представлена на рисунке 1. Изучены таблетки дженерика «Таваник», (производитель Санофи Винтроп Индустрия, серия 4CF5C, годен до 31.03.19) с указанным содержанием лекарственной субстанции 500 мг на таблетку. Вспомогательные вещества: кросповидон, гипромеллоза, целлюлоза микрокристаллическая, натрия стеарилфумарат.

Тетрациклин (II) – бактериостатический антибиотик группы тетрациклинов. Химическое название: [4S-(4альфа,4а альфа,5а альфа,6бета,12а альфа)]-4-(диметиламино)-1,4,4а,5,5а,6,11,12а-октагидро-3,6,10,12,12а-пентагидрокси-6-метил-1,11-диоксо-2-нафтаценкарбоксамид (в виде гидрохлорида или тригидрата). Брутто-формула: $C_{22}H_{24}N_2O_8$, M = 444,35 г/моль. Структурная формула представлена на рисунке 2. Изучены таблетки дженерика «Тетрациклин» (производитель РУП «Белмедпрепараты», серия 030116, годен до 02.19), содержащие тетрациклин в количестве 100 мг на таблетку. Вспомогательные вещества: сахароза, краситель арбутин Е-122 и другие, указанные в спецификации.

Комбинация сульфаметоксазола (III) и триметоприма (IV) – бактерицидные препараты широкого спектра действия. Химические названия: 4-амино-N-(5-метилизоксазол-3-ил)-бензолсульфонамид и 5-(3,4,5-триметоксибензил)пиримидин-2,4-диамин соответственно. Брутто-формулы и молекулярные массы: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$, M = 253 г/моль и $C_{14}H_{18}N_4O_3$, M = 290 г/моль соответст-

[1] Высокопольными принято называть спектрометры ЯМР, использующие в качестве источника магнитного поля сверхпроводящие магниты с криогенным охлаждением.

венно. Изучены таблетки препарата «Бисептол» (производитель «Польфа» (Польша), номер серии 41611062, годен до 01.07.2019), содержащие на одну таблетку специфицированное содержание 400 мг сульфаметоксазола и 80 мг триметоприма соответственно. Вспомогательные вещества: картофельный крахмал, тальк, магния стеарат, поливиниловый спирт, пропиленгликоль, метил-п-гидроксибензоат, пропил-п-гидроксибензоат.

В работе использованы следующие растворители и стандарты: хлороформ-d_1 (99,8 %, Sigma-Aldrich), метанол-d_4 (99,9 %, Sigma-Aldrich), гексаметилдисилоксан (ГМДС) (99,8 %, Sigma-Aldrich), трифторуксусная кислота (ХЧ), диметилсульфон ($ДМСО_2$) (ХЧ).

Стандартная пробоподготовка: измельчение таблеток в ступке, отбор точной навески, рассчитанной на 30 мг лекарственной субстанции и 1 мл растворителя, растворение в выбранном растворителе, встряхивание, обработка в УЗ-бане, отделение нерастворимых веществ центрифугированием, перенесение надосадочной жидкости в ампулы для ЯМР, добавление точной навески калибровочного соединения (если в качестве него не используется сигнал точно измеренных остаточных протонов дейтерированного растворителя). Доказательство полноты экстракции лекарственной субстанции из ЛС всегда контролировали по отсутствию ее сигналов в спектре ЯМР ^{1}H раствора перерастворенного осадка.

Для подтверждения отнесения сигналов в спектре ЯМР на 60 МГц и верификации количественных результатов использовали ЯМР-спектрометр JNM ECA 600 (Jeol, Япония), с рабочей частотой для ядер ^{1}H 600 МГц.

Общие условия регистрации спектров ЯМР на 60 и 600 МГц: ширина фильтра 18 м.д. с установкой несущей частоты 7,0 м.д., импульс 90°, задержка между импульсами 30 с, 32 К точек на спектр, автоматическая настройка фазы и базовой линии. Спектры регистрировали при температуре 23 °С на частоте 600 МГц и 36 °С на частоте 60 МГц. Обработку спектров проводили с помощью программного обеспечения Mnova NMR (MestreLab, Испания). Другие условия регистрации спектров для разных объектов могут определяться используемым растворителем, его концентрацией, выбором калибровочного сигнала для количественного определения интересующих соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Левофлоксацин. Спектры ЯМР ^{1}H левофлоксацина в ДМСО-d_6 [15] и D_2O [16] опубликованы ранее, хотя отнесение сигналов в обоих случаях содержало ошибки. Так, для группы COOH в ДМСО-d_6 указано положение сигнала в области 4,5–5,0 м.д., что не соответствует реальному спектру (15,03 м.д.). Обнаружено, что в качестве растворителя для левофлоксацина лучше подходит $CDCl_3$, в растворе которого разрешаются все сигналы ^{1}H на 600 МГц и их большинство на 60 МГц. Использовали $CDCl_3$ с точно измеренным содержанием остаточных протонов 0,2 %, т. е. 0,125 моль/мл.

Спектр ЯМР ^{1}H ЛС «Таваник» на частоте 600 МГц (рисунок 1а) содержит следующие сигналы ($CDCl_3$, δ, м.д., J/Гц): 1,58 (3H, д, J = 7,0 Гц, C_3H–CH_3); 2,34 (3H, с, N–CH_3); 2,46–2,58 (4H, м, H-13′, H-14′); 3,30–3,44 (4H, м, H-11′, H-12′); 4,34 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4.43 (1H, д, J = 11,1 Гц, H-2); 4,52–4,59 (1H, м, 3-H); 7,63 (1H, д, J = 12,3 Гц, H-8); 8,62 (1H, с, H-5); 15,03 (1H, уш.с., COOH).

Спектр полностью соответствует структурной формуле субстанции, сигналов вспомогательных веществ не содержит. Расчет содержания субстанции выполнен по соотношению интегральных интенсивностей ее сигналов и протонов остаточных молекул $CHCl_3$ в растворителе по уравнению, рекомендованному в Государственной фармакопее РФ XIII издания (ОФС.1.2.1.1.0007.15) и учитывающему массы компонентов (m), их молярные массы (M), интенсивность отдельных сигналов, нормированных по числу эквивалентных протонов (I):

$$m(C) = [m(CHCl_3)/M(CHCl_3)] \times [I(C)/I(CHCl_3)] \times M(C).$$

Средний результат трех независимых измерений содержания субстанции в таблетках – 497,7 ± 2,9 мг на таблетку. Для левофлоксацина в качестве индикаторных использованы сигналы протонов у C_5 и C_8 при 8,62 м.д. и 7,63 м.д. соответственно. Для количественного определения субстанции при 600 МГц также удобно использовать сигнал метильной группы C–CH_3, имеющий химический сдвиг 1,58 м.д.

Спектр ЯМР ^{1}H на частоте 60 МГц (рисунок 1, б) содержит те же группы пиков и с теми же химическими сдвигами, однако некоторые (протоны у C_2 и C_3 в области около 4,5 м.д. и группы CH_2 и CH_3 в области около 2,5 м.д.) перекрываются из-за возросшего влияния спин-спинового взаимодействия на вид спектра. Наиболее очевидно это проявляется для сигналов протонов у C_8, являющегося дублетом с константой J = 12,3 Гц за счет вицинального взаимодействия с ядром ^{19}F, и C–CH_3 группы. Над каждым пиком в спектре ЯМР ^{1}H на частоте 60 МГц указано число протонов, ответственных за него. Число и положение пиков в спектре на частоте 60 МГц, как и стехиометрическое соответствие их интенсивностей строению молекулы обеспечивают однозначную идентификацию левофлоксацина.

Количественное определение содержания субстанции в таблетке по спектру 60 МГц сделано путем усреднения трех независимых измерений с использованием в каждом случае трех отдельных сигналов протонов у C_5 и C_8 и C–CH_3-группы. Результаты: (484,8 ± 5,0), (485,3 ± 5,0) и (486,5 ± 5,0) мг на таблетку соответственно, т.е. отклонение не более 3 % от заявленного производителем.

Тетрациклин. ЯМР-спектр на 600 МГц ЛС в растворителе CD_3OD (рисунок 2, а) содержит следующие сигналы (δ, м.д., J/Гц): 1,62 (с, 3H, –CH_3); 1,93 (дд, 1H, H-5); 2,10 (ддд, 1H, H-5′); 2,66 (ддд, 1H, H-4a); 2,72 (с, 6H, $N(CH_3)_2$); 2,97 (дд, 1H, H-5a); 3,44-3.52 (уш. сигнал, 1H, H-4); 6,90 (д, 1H, J = 8,2; H-9); 7,14 (д, 1H, J = 7,7; H-7); 7.49 (т, 1H, J = 8,1; H-8). Его характеристики полностью совпадают с известными данными [17]. Помимо сигна-

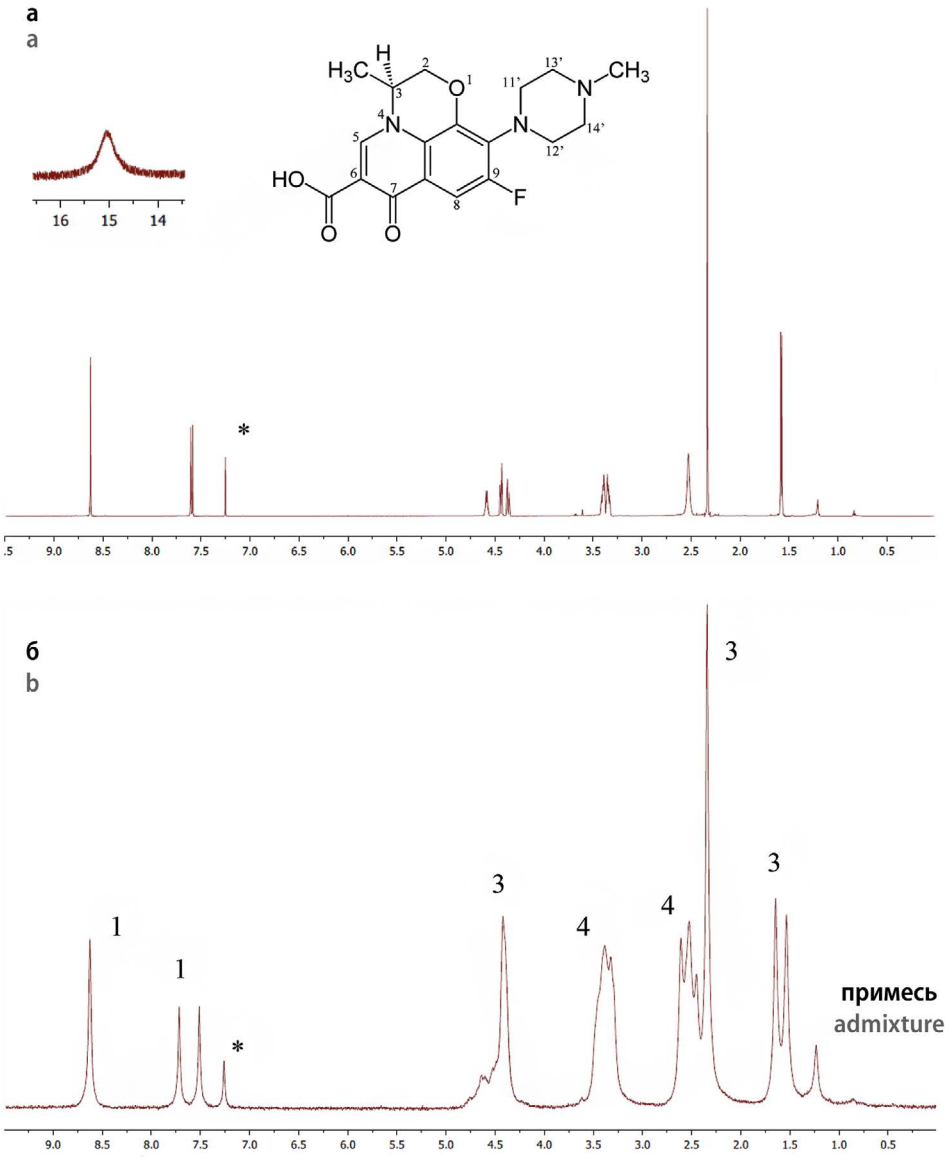


Рисунок 1. Спектр ЯМР ^{1}H ЛС «Таваник» в $CDCl_3$:

а – на частоте 600 МГц (отдельно показан сигнал протона карбоксильной группы); б – на частоте 60 МГц; * – сигнал калибровочного соединения $CHCl_3$

Figure 1. ^{1}H NMR spectrum of drug "Tavanic" in $CDCl_3$:

a – at a frequency of 600 MHz (the signal of the proton of the carboxyl group is shown separately); b – at a frequency of 60 MHz; * – signal of the calibration compound $CHCl_3$

лов субстанции спектр ЯМР ^{1}H содержит ряд минорных пиков вспомогательных веществ в областях от 0,8 до 5,4 м.д. Для их устранения регистрацию спектра на 60 МГц выполнили также для экстракта из ЛС растворителем ДМСО-d_6, в котором положение сигналов протонов незначительно изменилось, но появились сигналы отсутствующих в растворителе CD_3OD протонов ОН-групп, дополнительно подтверждающие формулу и согласующиеся с литературными данными [18].

Спектр в CD_3OD на 60 МГц выглядит существенно сложнее из-за перекрывания мультиплетов отдельных протонов, за исключением сигнала группы C_6–CH_3. Подтверждение строения субстанции в серии проб удобно выполнять путем сравнения профилей их спектров и уже подтвержденного (см. рисунок 2, б) образца. Этот прием аналогичен широко используемому в Фармакопеях различных стран для ИК-спектров. Т. е. представленный на рисунке 2, б спектр в CD_3OD может быть рекомендован как вторичный стандарт при идентификации других препаратов тетрациклина.

Количественное определение содержания субстанции в растворе в CD_3OD выполнено путем сравнения интенсивности сигнала добавленной навески гексаметилдисилоксана с суммарной интегральной интенсивностью трех ароматических протонов H_7, H_8 и H_9 в области 6,5–7,7 м.д. При измерении на 600 МГц

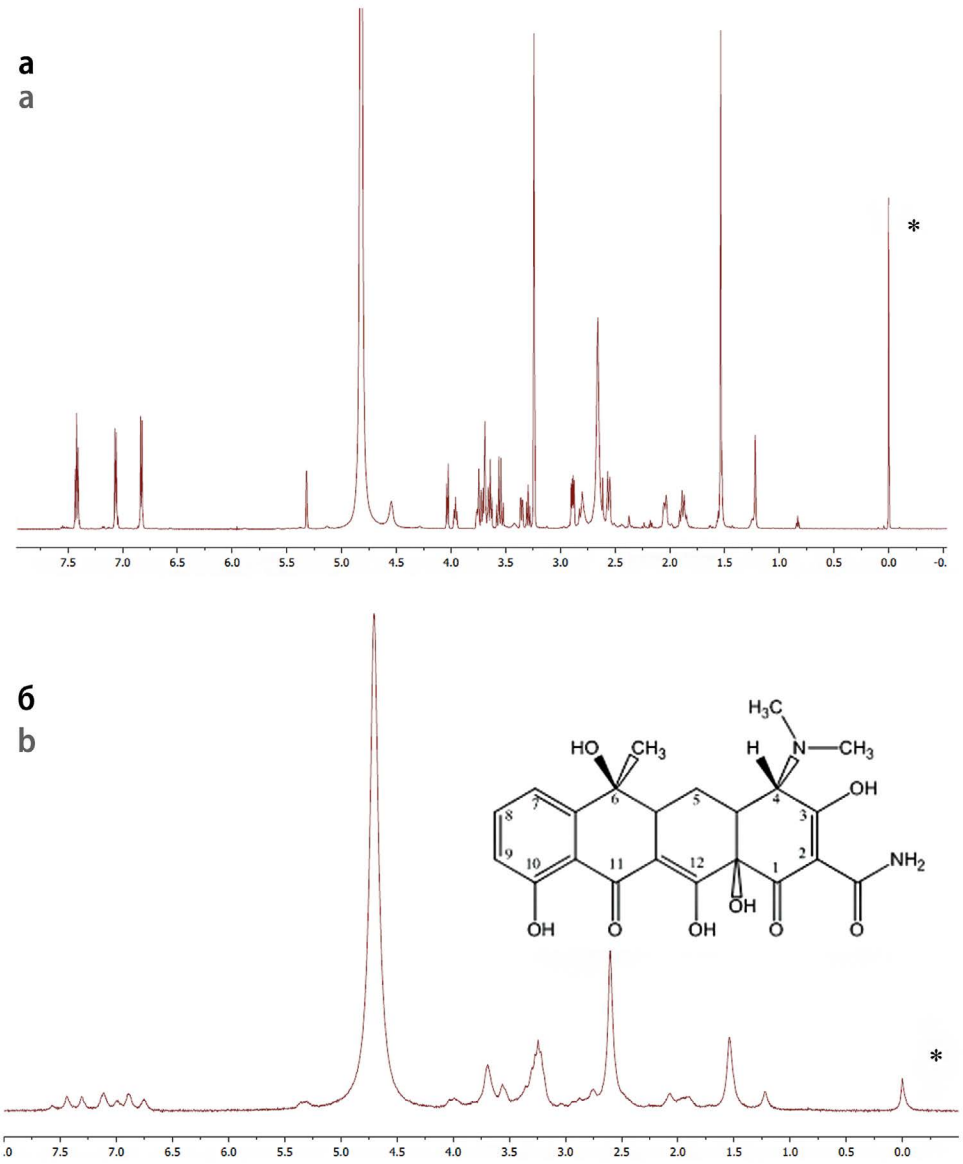


Рисунок 2. Спектры ЯМР ^{1}H ЛС «Тетрациклин» в CD_3OD:
а – на частоте 600 МГц; б – на частоте 60 МГц; * – сигнал калибровочного соединения $(CH_3)_3SiOSi(CH_3)_3$

Figure 2. ^{1}H NMR spectra of medicines Tetracycline in CD_3OD:
a – at a frequency of 600 MHz; b – at a frequency of 60 MHz; * – signal of calibration connection $(CH_3)_3SiOSi(CH_3)_3$

содержание субстанции рассчитано (101,4 ± 1,6) мг на таблетку, а для 60 МГц – (96,8 ± 3,5) мг на таблетку, что соответствует декларированному значению. В обоих случаях результаты являются усредненными значениями для трех независимых образцов.

Композиция сульфаметоксазол – триметоприм. Выполнен скрининг подлинности таблеток комбинированного антимикробного препарата «Бисептол», содержащего на одну таблетку (~660 мг) специфицированное содержание 400 мг сульфаметоксазола (III) и 80 мг триметоприма (IV).

Интерпретация спектра ЯМР ^{1}H раствора ЛС «Бисептол» в ДМСО-d_6 на частоте 600 МГц и вопрос количественного определения компонент обсуждались нами ранее [13].

Содержание лекарственных субстанций по спектру на 600 МГц в ДМСО-d_6 легко определять сравнением интегральных интенсивностей сигнала трех протонов CH_3-группы III при 2,27 м.д. и шести протонов двух эквивалентных групп IV при 3,72 м.д. с сигналом остаточных протонов молекул растворителя ДМСО-d_5 (2,50 м.д.) по приведенной выше формуле. В частности, в навеске массой 52,6 мг (масса таблетки «Бисептола» 666,4 мг) обнаружено сульфаметоксазола 32,2 мг и триметоприма 6,3 мг, что при пересчете на целую таблетку составило содержание сульфаметоксазола и триметоприма (408,7 ± 4,1) и (79,9 ± 0,8) мг соответственно, что согласуется с указанными производителем значениями. Полученные результаты для двух других навесок отличались от представленной не более чем на 2 %.

В спектре ЯМР ^{1}H на частоте 60 МГц в растворителе ДМСО-d_6 разрешение некоторых сигналов оказалось существенно хуже из-за близости отдельных групп и мультиплетности, а использование сигнала остаточных протонов молекул ДМСО-d_5 для количественного определения субстанций в ЛС оказалось невозможным из-за его перекрывания с сигналом протонов CH_3-группы III при 2,27 м.д. Поэтому выполнена регистрация спектра раствора ЛС в трифторуксусной кислоте с добавкой $(CH_3)_2SO_2$ (3,0 м.д.) в качестве калибровочного пика, с сигналом которого сравнивали нормированные интегральные интенсивности трех протонов CH_3-группы III при 2,27 м.д. и совокупности одиннадцати протонов IV в области 3,5–4,0 м.д. (рисунок 3). Расчет – (401,2 ± 8,0) мг на таблетку III и (77,6 ± 2,0) мг на таблетку IV – хорошо согласуется как с результатом для 600 МГц, так и с заявленными значениями.

Обобщенные результаты количественного определения содержания рассмотренных лекарственных субстанций в ЛС представлены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлено три примера быстрого скрининга ЛС с использованием спектроскопии ЯМР ^{1}H на рабочей частоте 60 МГц для идентификации и определения содержания лекарственных субстанций. В первом (левофлоксацин) характер спектра позволяет полностью его интерпретировать и количественно измерить содержание лекарственных субстанций. Во втором (тетрациклин) усложненная спектральная картина требует для однозначной идентификации стро-

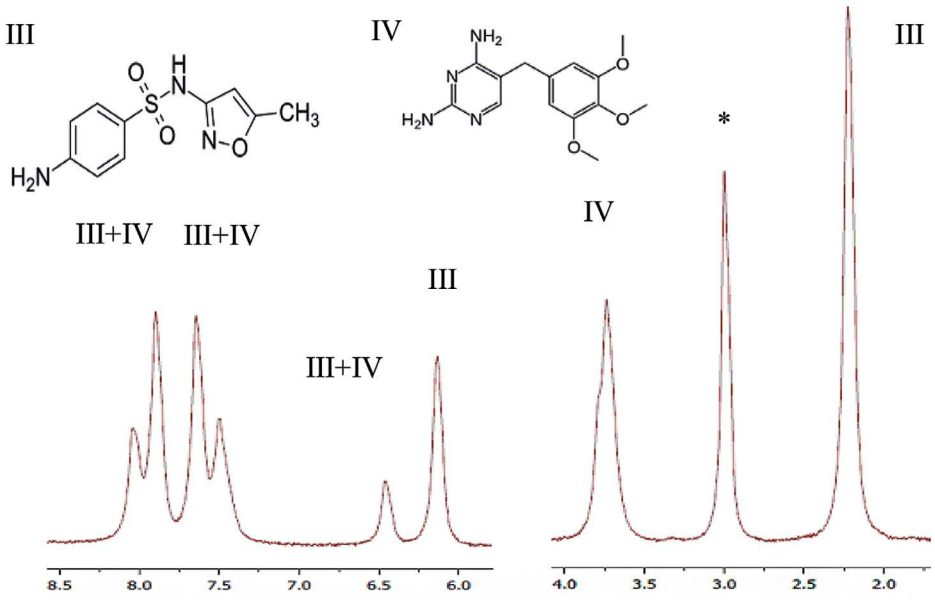


Рисунок 3. Спектр ЯМР ^{1}H препарата «Бисептол» на частоте 60 МГц в трифторуксусной кислоте.
*** – сигнал $(CH_3)_2SO_2$**

Figure 3. ^{1}H NMR spectrum of the drug "Biseptol" at a frequency of 60 MHz in trifluoroacetic acid.
*** – signal $(CH_3)_2SO_2$**

Таблица 1. Результаты определения содержания лекарственных субстанций в ЛС

Table 1. Results of determining the content of medicinal substances in drugs

№	Название ЛС Drug name	Лекарственная субстанция Medicinal substance	Содержание, мг на таблетку Content, mg per tablet		
			Заявленное производителем Declared by the manufacturer	Измерено на спектрометре 600 МГц Measured on a 600 MHz spectrometer	Измерено на спектрометре 60 МГц Measured on a 60 MHz spectrometer
I	Таваник Tavanik	Левофлоксацин Levofloxacin	500	497,7 ± 2,9	485,3 ± 5,0
II	Тетрациклин Tetracycline	Тетрациклин Tetracycline	100	101,4 ± 1,0	96,8 ± 1,5
III	Бисептол Biseptol	Сульфаметоксазол Sulfamethoxazole	400	408,7 ± 4,1	401,2 ± 8,0
IV	Бисептол Biseptol	Триметоприм Trimethoprim	80	79,9 ± 0,8	77,6 ± 2,0

ения предварительного анализа спектра ^{1}H на более высоких частотах, а спектр на 60 МГц используется в формате «отпечатка пальцев» с количественным определением субстанции путем сравнения интенсивностей совокупности выделенных индикаторных и калибровочного сигналов. Для отдельных ЛС, содержащих композицию лекарственных субстанций (сульфаметоксазол + триметоприм), усложнение количественной интерпретации спектра на 60 МГц может быть преодолено сменой растворителя и калибранта.

Представленные результаты демонстрируют возможности спектрометра ЯМР ^{1}H 60 МГц для быстрой идентификации и измерения в ЛС содержания лекарственных субстанций без применения стандартных образцов. По экономичности, быстроте и информативности методики на основе спектров ЯМР на рабочей частоте 60 МГц могут заметно превосходить применяемые ныне хроматографические и оптические. Приготовление трех независимых проб, регистрация их спектров и расчет результатов без использования стандартных образцов занимает менее часа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Varcarcel M., Caerdenas S., Gallego M. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trends in Anal. Chem*. 1999;18(11):685–694.
2. Danieli E., Mauler J., Perlo J., Blumich B., Casanova F. Mobile sensor for high resolution NMR spectroscopy and imaging. *J. Mag. Res*. 2009;198(1):80–87.
3. Danieli E., Perlo J., Blumich B., Casanova F. Small magnets for portable NMR spectrometers. *Angewandte Chemie*. 2010;49(24):4133–4135.
4. Jacobsen N. E. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.
5. Friebolin H. Basic One – and Two-Dimentional NMR Spectroscopy. 5th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
6. Berger S., Braun S. 200 and more NMR Experiments A Practical Course. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
7. Dalitz F., Cudaj M., Maiwald M., Guthausen G. Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy. *Prog. Nuc. Mag. Res. Spec*. 2012;60:52–70.
8. Edwards J. C., Giammatteo P. J. Progress NMR Spectroscopy: Technology and On-line Applications. Chapter 10 in Process Analytical Technology: Spectroscopic tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 2nd ed. Hoboken: Blackwell-Wiley; 2010.
9. Edwards J. C., A Review of Applications of NMR Spectroscopy in Petroleum Chemistry. Chapter 16 in Monograph 9 on Spectroscopic Analysis of Petroleum Products and Lubricants. West Conshohocken: ASTM Books; 2011.
10. Gonilleux B., Cherrie B. Ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer: Application and perspectives. *Trends in Anal. Chem*. 2016;83:65–75.
11. Pages G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M. Evaluation of a Benchtop Cryogen-Free Low-Field ^{1}H NMR Spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances. *Anal. Chem*. 2014;86:11897–11904.
12. Parker T., Limer E., Watson A.D., Defernez M., Williamson D., Kamsley E.K. 60 MHz 1H NMR Spectroscopy for the analysis of edible oils. *Trends in Anal. Chem*. 2014;57:147–158.
13. Калабин Г., Васильев В., Чернецова Е., Прокопьев А., Абрамович Р., Ивлев В., Митео И. Экспертиза качества лекарственных средств без стандартных образцов. *Аналитика*. 2017;2(33):106–112.
14. Кудякова В., Чазов А. Полноценный ЯМР-анализ на лабораторном столе: ЯМР-спектрометры Spinsolve компании Magritek. *Аналитика*. 2017;2(33):80–83.
15. Salem A. A., Mossa H. A., Barsoum B. N. Quantitative determination of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*. 2005;62:466–472.
16. Salem A. A., Mossa H. A. Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry. *Talanta*. 2012;88:104–114.
17. Othersen O. G., Waibel R., Lanig H., Gmeiner P., Clark T. SCRF-DFT and NMR Comparison of Tetracycline and 5a,6-Anhydrotetracycline in Solution. *J. Phys. Chem. B*. 2006;110:24766–24774.
18. Casy A. F., Yasin A. Stereochemical studies of tetracicline antibiotics and their common impurities by 400 MHz ^{1}H NMR spectroscopy. *Mag. Res. in Chem*. 1985;23(9):767–770.

REFERENCES

1. Varcarcel M., Caerdenas S., Gallego M. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trends in Anal. Chem*. 1999;18(11):685–694.
2. Danieli E., Mauler J., Perlo J., Blumich B., Casanova F. Mobile sensor for high resolution NMR spectroscopy and imaging. *J. Mag. Res*. 2009;198(1):80–87.
3. Danieli E., Perlo J., Blumich B., Casanova F. Small magnets for portable NMR spectrometers. *Angewandte Chemie*. 2010;49(24):4133–4135.
4. Jacobsen N. E. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.
5. Friebolin H. Basic One – and Two-Dimentional NMR Spectroscopy. 5th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
6. Berger S., Braun S. 200 and more NMR Experiments A Practical Course. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
7. Dalitz F., Cudaj M., Maiwald M., Guthausen G. Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy. *Prog. Nuc. Mag. Res. Spec*. 2012;60:52–70.
8. Edwards J. C., Giammatteo P. J. Progress NMR Spectroscopy: Technology and On-line Applications. Chapter 10 in Process Analytical Technology: Spectroscopic tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries, 2nd ed. Hoboken: Blackwell-Wiley; 2010.
9. Edwards J. C., A Review of Applications of NMR Spectroscopy in Petroleum Chemistry. Chapter 16 in Monograph 9 on Spectroscopic Analysis of Petroleum Products and Lubricants. West Conshohocken: ASTM Books; 2011.
10. Gonilleux B., Cherrie B. Ultrafast 2D NMR on a benchtop spectrometer: Application and perspectives. *Trends in Anal. Chem*. 2016;83:65–75.
11. Pages G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M. Evaluation of a Benchtop Cryogen-Free Low-Field ^{1}H NMR Spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances. *Anal. Chem*. 2014;86:11897–11904.
12. Parker T., Limer E., Watson A.D., Defernez M., Williamson D., Kamsley E.K. 60 MHz 1H NMR Spectroscopy for the analysis of edible oils. *Trends in Anal. Chem*. 2014;57:147–158.
13. Kalabin G., Vasil'ev V., Chernetsova E., Prokop'ev A., Abramovich R., Ivlev V., Miteo I. *Ekspertiza kachestva lekarstvennykh sredstv bez standartnykh obraztsov* [Examination of the quality of medicines without standard samples]. *Analitika = Analytics*. 2017;2(33):106–112. (In Russ.).
14. Kudyakova V., Chazov A. *Polnotsennyy YaMR-analiz na laboratornom stole: YaMR-spektrometry Spinsolve kompanii Magritek* [Complete NMR Analysis on the Bench: Magritek Spinsolve NMR Spectrometers]. *Analitika = Analytics*. 2017;2(33):80–83. (In Russ.).
15. Salem A. A., Mossa H. A., Barsoum B. N. Quantitative determination of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*. 2005;62:466–472.
16. Salem A. A., Mossa H. A. Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry. *Talanta*. 2012;88:104–114.
17. Othersen O. G., Waibel R., Lanig H., Gmeiner P., Clark T. SCRF-DFT and NMR Comparison of Tetracycline and 5a,6-Anhydrotetracycline in Solution. *J. Phys. Chem. B*. 2006;110:24766–24774.
18. Casy A. F., Yasin A. Stereochemical studies of tetracicline antibiotics and their common impurities by 400 MHz ^{1}H NMR spectroscopy. *Mag. Res. in Chem*. 1985;23(9):767–770.

X-Pulse

АВРОРА
ТЕХНОЛОГИИ ИЗМЕРЕНИЙ

Никаких компромиссов

Взаимозаменяемые блоки X-Pods позволяет пользователю оптимизировать отношение сигнал-шум для конкретных ядер

Простота технического обслуживания

Съемная измерительная ячейка легко доступна для очистки и обслуживания при необходимости

Проточная ячейка позволяет наблюдать за реакциями в реальном времени и изучать кинетику.

Более четкие спектры

Новая технология затемнения позволяет получать спектральное разрешение <0,35 Гц уже в стандартной комплектациию. Соотношение сигнал/шум более чем 300:1 пик к пику.

Возможность выбора ядер

Работайте на любых ярах, применяемых в ЯМР –^{1}H, ^{19}F, ^{13}C, ^{31}P, ^{29}Si, ^{23}Na, ^{11}B, ^{7}Li и т.д. одновременно на одном инструменте.

OXFORD INSTRUMENTS

Новейший настольный свободно конфигурируемый широкополосный ЯМР-спектрометр высокого разрешения

Простота эксплуатации

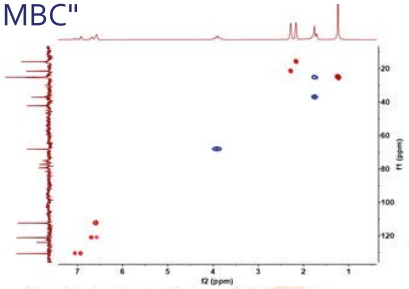
Быстрые эксперименты позволяют проводить сложные импульсные последовательности в один щелчок, предоставляя доступ к мощности ЯМР любому пользователю

Максимальная стабильность

Работа с пробой при переменной температуре (20°C — 70°C) без спектральных артефактов. Запуск импульсных последовательностей интенсивного рабочего цикла без дестабилизации магнита

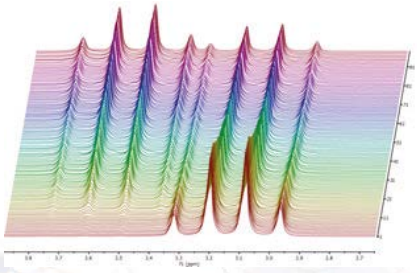
Гибкое программное обеспечение

Расширенный режим SpinFlow позволяет пользователю выбрать и настроить любые двумерные эксперименты, включая HSQC-ME и HMBC"



Удобство в настольном применении

Нет необходимости в специальных средствах или жидких криогенах, что позволяет использовать прибор везде, где это удобно



ООО «Аврора»
Телефоны: (495) 258-83-05(06)

www.pulsarnmr.com
www.avrora-test.ru

E-mail: sales@avrora-lab.com
chistyakov@avrora-lab.com

Рекламный материал/Advertising material

Оснащение лабораторий от А до Я

Материал предоставлен компанией ООО ТД «ХИММЕД»

Laboratory equipment from A to Z

Material provided by CHIMMED company

Компания ХИММЕД без малого 30 лет успешно работает на отечественном рынке в сфере оснащения лабораторий различного профиля. Сегодня это крупнейший в стране дистрибьютор химических реактивов, лабораторного, аналитического и биохимического оборудования. Кроме того, ХИММЕД активно развивает собственное производство растворителей. Профессионализм команды и широчайший ассортимент продукции мирового уровня высоко ценят потребители по всей России, а также в странах ближнего зарубежья.

НАДЕЖНЫЙ ПОСТАВЩИК, УСПЕШНЫЙ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ХИММЕД – надежный и ответственный партнер, которому доверяют уже более 6000 клиентов. И это количество ежегодно увеличивается.

Ключевое преимущество поставщика в том, что ХИММЕД оснащает лаборатории полностью, под ключ. Клиенты получают возможность заказать все необходимое для лаборатории в одном месте и этим, безусловно, экономят время и собственные средства.

ХИММЕД – официальный дистрибьютор ведущих мировых производителей реактивов и оборудования для лабораторий. В их числе – Thermo Fisher Scientific (Thermo Scientific, Applied Biosystems, Invitrogen, Gibco, Ion Torrent, Nunc), USP, Acros Organics, Merck, Merck Millipore, Sigma-Aldrich, Roth, IKA, Honeywell, Mettler toledo, A&D, Bio-Techne (R&D, Tocris, Novus biologicals), Macherey-Nagel, Liebherr, neoFroxx, Corning, Scharlau, Sartorius и многие другие. Ассортимент предлагаемых товаров очень широк – более миллиона позиций.

Многолетние дилерские отношения с российскими и зарубежными поставщиками и производителями дают компании широкие возможности для того, чтобы удовлетворять все требования заказчиков. Так, ХИММЕД предлагает оборудование по заводским ценам, проводит его сервисное и гарантийное обслуживание. Помимо этого, специалисты могут провести обучение и подготовку сотрудников заказчика в квалифицированных сервисных центрах.

Но ХИММЕД – это не только авторитетный и надежный поставщик, но и конкурентоспособный производитель растворителей высокой степени очистки, а также средств радиационной безопасности.

С каждым годом компания наращивает объемы выпуска востребованной на рынке продукции. ХИММЕД – первый и единственный в России производитель метанола, ацетонитрила и изооктана для градиентной хроматографии. ХИММЕД также производит другие органические растворители, предназначенные для использования в химическом производстве, на фармацевтических, нефтеперерабатывающих предприятиях, в научно-исследовательской и лабораторной практике, реактивы для бассейнов и средства дезактивации – порядка 285 наименований товаров.

Кроме того, ХИММЕД ведет фасовку химической продукции с особыми свойствами и условиями (в том числе веществ 1-го и 2-го классов опасности).

ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ КОМАНДА, МОЩНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Успех компании на рынке целиком и полностью зависит от компетентности, профессионализма и энергии ее сотрудников. ХИММЕД обладает мощным кадровым потенциалом: здесь трудится порядка 400 специалистов высокой квалификации, из них 12 кандидатов наук.

Головной офис компании находится в Москве, филиалы – в Санкт-Петербурге, Казани и Новосибирске.

Собственная сеть логистики позволяет компании осуществлять регулярные поставки грузов между складом в Европе и складом в Москве со строгим соблюдением условий транспортировки и хранения химической и биологической продукции, в т. ч. глубокого и длительного замораживания от –20 до –80 °С, а также –140 °С и –196 °С. ХИММЕД берёт на себя все заботы по таможенному оформлению грузов.

Еще одна составляющая успешной работы организации – наличие крепкой производственно-технической базы. Сейчас она включает собственные производственные, складские и офисные площади, а также солидный парк транспорта для международных перевозок и доставки продукции внутри России. Ежедневный складской ассортимент насчитывает более 8000 наименований.

Новый уровень измерения CHO Host Cell Protein для биофармацевтических производств

Измерение остаточного количества белка клеточной линии CHO (CHO Host Cell Protein – CHO-HCP) является критически важным этапом контроля качества при разработке биофармацевтических препаратов. Присутствие примесей CHO-HCP в конечном продукте может влиять на эффективность препарата, вызывать нежелательную иммунную реакцию или влиять на стабильность препарата.

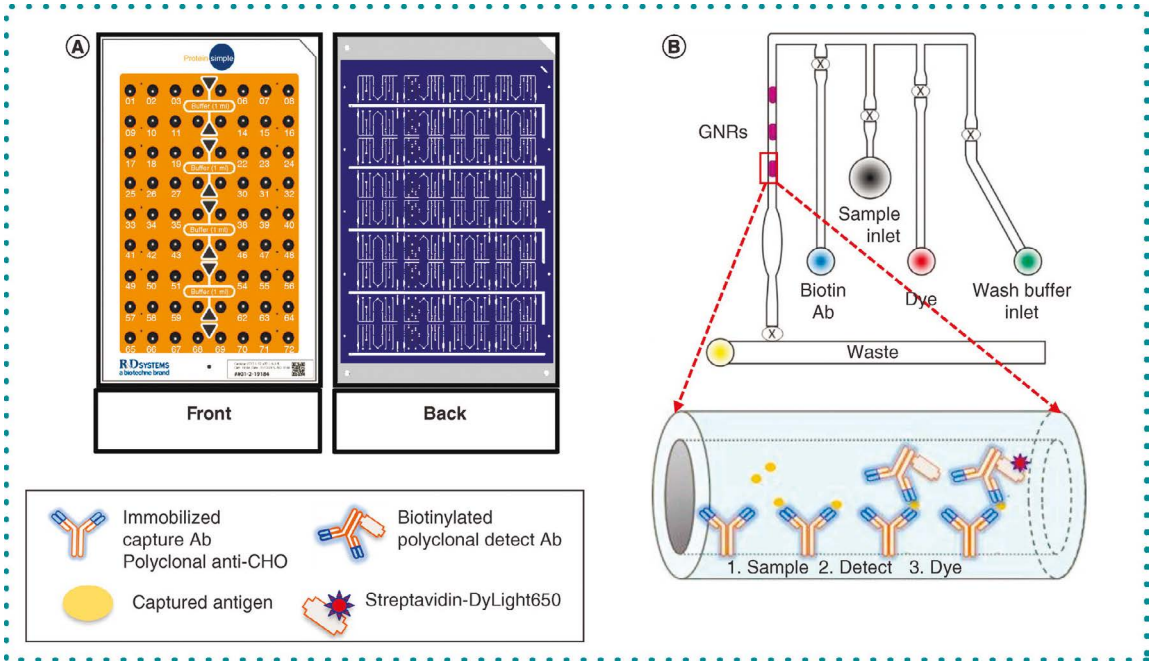
Золотым стандартом определения примесей CHO-HCP считается набор CHO-HCP ELISA kit, 3G-1 от Cygnus Technologies.

В настоящее время Cygnus Technologies совместно с корпорацией Bio-Techne (бренд ProteinSimple) разработали автоматизированный способ детекции CHO-HCP на платформе иммуноферментного анализатора ELLA.

ELLA проводит ИФА в микрофлюидных картриджах **Simple Plex**. Это похоже на готовый ИФА-набор, но все реактивы уже загружены в картридж, в том числе стандарты для калибровочной кривой.

- Весь процесс иммуноферментного анализа полностью автоматизирован – «работа руками» сведена к минимуму. Требуется только разбавление образца до нужной концентрации и его загрузка в картридж.
- От подготовки образцов до получения готового результата – 75 минут.
- Технология Simple Plex обеспечивает высокий уровень воспроизводимости результатов. Изо дня в день ИФА проходит одинаково.
- Работа на анализаторах ELLA позволяет получать воспроизводимые данные как в масштабах одной лаборатории, так и в масштабах всех производственных комплексов фармацевтического производства.

Устройство картриджа Simple Plex для диагностики на CHO-HCP

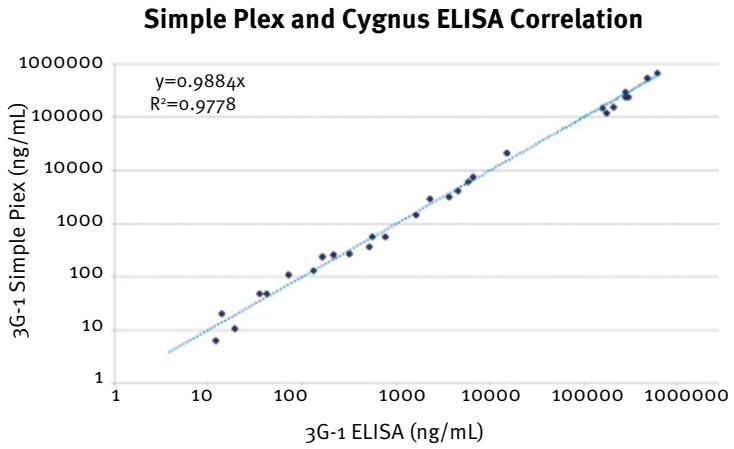


Антитела Cygnus были оценены на реактивность к более чем 1000 отдельных Host Cell Protein (HCP), которые присутствуют в штаммах CHO. Реактивность оценивалась с помощью современных методов аффинной экстракции антител и масс-спектрометрии.

В таблице справа приведены данные нижнего (LLOQ) и верхнего (ULOQ) пределов количественного определения CHO-HCP.

Simple Plex CHO-HCP 3G-1 Assay	
LLOQ	0,26 ng/mL
ULOQ	400 ng/mL

В картриджах Simple Plex для анализа CHO-HCP применяются те же антитела, которые используются в наборе Cygnus CHO HCP ELISA Kit, 3G-1. Ниже приведена линейная корреляция между анализами Cygnus CHO HCP 3G-1 ELISA и Simple Plex CHO HCP 3G-1



Картридж Simple Plex CHO HCP 3G-1 позволяет одновременно анализировать 72 образца за один запуск.

Анализ Simple Plex CHO HCP 3G-1 на платформе ELLA соответствует требованиям GMP и готов к установке в лабораториях GMP.

Выведите ваши исследования CHO-HCP на качественно новый уровень с автоматизированным и оптимизированным рабочим процессом от ELLA и высококачественным иммуноферментным анализом от Cygnus Simple Plex Assay.

Химмед является единственным официальным поставщиком ELLA в комплекте с CHO-HCP Simple Plex Assay 3G-1. За информацией по продукции и информацией для заказа обращайтесь на почту biopharm@chimmed.ru

Москва, 115230, Каширское шоссе, д. 3, кор. 2, стр. 4/9, БЦ Сириус Парк.
+7 (495) 640 4192,
biopharm@chimmed.ru

Санкт-Петербург, 195248, просп. Энергетиков, д. 19, оф. 314.
+7 (812) 605 0061, spb@chimmed.ru

Казань, 420081, ул. Седова, д. 22.
+7 (843) 273 6761,
kazan@chimmed.ru

Новосибирск, 630090, просп. Академика Лаврентьева, 6/1.
+7 (383) 227 9974, sibir@chimmed.ru

Вторая ежегодная конференция «Что происходит на рынке БАД?»

30 ноября 2020 г. состоялась Вторая ежегодная конференция «Что происходит на рынке БАД?», единственное в России экспертное мероприятие с фокусом только на вопросах индустрии БАД.

Мероприятие вновь прошло при поддержке ведущей профильной организации СРО «Союз производителей БАД к пище». Партнерами мероприятия стали компании Solgar (один из ведущих мировых производителей натуральных биологически активных добавок премимум-класса) и Sooplata (сервисная платформа для программ поддержки пациентов, карточных проектов и трейд-маркетинга в аптеках и интернете). В роли экспонента выступила компания «10 MED», национальный экспортер изделий медицинского назначения, косметической, парафармацевтической продукции, БАД, лекарственных средств и продуктов питания. Шоколадным партнером события стала компания «Конфаэль».

Открывала деловую программу конференции сессия под названием «Завтрак с аналитиком. Рынок БАД сегодня – итоги пандемии и перспективы развития 2021». В роли ведущей завтрака выступила директор отдела стратегических исследований компании DSM Group **Юлия Нечаева**, рассказавшая участникам мероприятия о текущем состоянии рынка БАД в условиях изменения покупательской способности под влиянием пандемии. По данным DSM Group, на сегодняшний день доля БАД в аптечных продажах в России доходит до 5 %, в то время как для компаний-производителей БАД на канал аптечных продаж приходится более 80 % от реализации своей продукции.

Следующей сессией, состоявшейся в рамках конференции, стала стратегическая дискуссия на тему «Капитаны рынка БАД в откровенном разговоре о дистанционной торговле». Модератором дискуссии стал **Александр Жестков**, исполнительный директор СРО «СП БАД», а компанию ему составили спикеры, представляющие ведущие российские и международные компании-производители продукции БАД: **Сергей Лебедев** (директор по связям с органами государственной власти, «Алиэкспресс Россия»), **Алексей Михайлов** (генеральный директор, Queisser Pharma), **Наталия Прокопьева** (председатель совета директоров, «Эвалар») и **Мурат Хакан Эртюрк** (генеральный директор в России и странах СНГ, Solgar).

По мнению **Сергея Лебедева**, главным предварительным итогом пандемии является появление 10 млн новых покупателей в интернете. «Сотрудничество с маркетплейсами является способом масштабирования для мелких игроков и диверсификацией – для крупных», – заключил спикер. **Алексей Михайлов** в своем выступлении подробно остановился на вопро-

сах трансграничной торговли продукцией БАД, главной проблемой которой является перекос цен для разных групп покупателей в том случае, если у компании-производителя отсутствует единая ценовая политика для всех рынков. Говоря о текущих бизнес-показателях компании «Эвалар», **Наталья Прокопьева** назвала аптечный сегмент основным каналом продаж, на который приходится порядка 90 % реализованной продукции. *«При этом пандемия постепенно меняет расклад, и мы видим активный, более чем двукратный рост е-кома»*, – подытожила **Наталья**. **Мурат Хакан Эртюрк**, в свою очередь, обратил внимание участников дискуссии на важность прозрачности и понятного регулирования рынка БАД, а также необходимость наличия четких правил игры для маркетплейсов, в том числе в вопросах трансграничной торговли.

Продолжила деловую программу мероприятия пленарная дискуссия «Закон и бизнес: регуляторная мозаика – ограничения, изменения, нормы, регламент», в роли модератора которой также выступил **Александр Жестков** (СРО «СП БАД»). В число спикеров сессии вошли **Владимир Бессонов** (заведующий лабораторией химии пищевых продуктов доктор биологических наук, ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), **Елена Боковая** (заместитель начальника отдела организации и оказания государственных услуг Управления организации контрольно-надзорной деятельности и оказания государственных услуг, Роспотребнадзор), **Дмитрий Миклин** (директор по регуляторным вопросам, Herbalife Nutrition), **Алексей Петренко** (генеральный директор, EAS Strategic), **Александр Петров** (член Комитета Госдумы по охране здоровья), **Елена Плетнева** (директор по техническому регулированию, Amway) и **Светлана Орлова** (заведующая кафедрой диетологии и клинической нутрициологии профессор, РУДН).

Открывала дискуссию **Елена Боковая**, рассказавшая участникам конференции о последних изменениях в техрегламенте и требованиях к регистрации продукции БАД в России и странах ЕАЭС. **Александр Петров** в ходе своего выступления назвал одной из главных проблем индустрии БАД, к которой приковано внимание государства, восприятие людьми БАД в качестве лекарственных средств. Этому, по словам спикера, в частности, способствуют схожесть упаковок БАД и ЛС, агрессивная рекламная компания, отсылка к рекомендациям врачей и медицинским исследованиям. *«Все это заставляет задуматься о необходимости дополнительного контроля за данной сферой со стороны государства, чтобы определить правильное место для БАД в структуре питания населения»*, – заключил спикер. По мнению **Дмитрия Миклина**, на сегодняшний день отрасль БАД испытывает серьезное давление со стороны трансграничной торговли, в первую очередь посредством международных интернет-магазинов и маркетплейсов, что является причиной появления на рынке контрафакта, а также продукции, не отвечающей требованиям техрегламента. **Алексей Петренко** обратил внимание участников дискуссии на положительный эффект введения регуляторной системы БАД, которая в перспективе должна способствовать развитию отрасли и гармонизации процедур соответствия среди стран-участниц ЕАЭС.

Следующим блоком деловой программы стало интервью на сцене **Татьяны Никитиной**, начальника управления контроля рекламы и недобросовестной конкуренции ФАС России, прошедшее в формате видеообращения спикера. Тема интервью: «Все, что нужно знать об ограничениях в рекламе БАД». **Татьяна Никитина** призвала производителей БАД к ответственному отношению в вопросах рекламы и информирования населения о выпускаемой продукции и ее свойствах. При этом, по словам представителя регулятора, спорной рекламы в последнее время становится меньше, а участники рынка вправе размещать на интернет-ресурсах информацию о преимуществах своей продукции, не являющуюся рекламной.

Завершала конференцию сессия «Helicopter View: маркетинг и продажи БАД в эпоху Covid-19 – уроки пандемии». Модератором сессии стала **Мария Русинова**, коммерческий директор компании «ФармОушен Лаб», а места спикеров заняли: **Алик Батоян** (генеральный директор, «Сооплата»), **Евгений Гордеев** (совладелец, группа компаний Breffi, президент бизнес-клуба «Эквиум»), **Ованес Давидян** (генеральный директор, «Авиценна»), **Марина Камаева** (заместитель генерального директора по маркетингу, Solgar), **Вячеслав Краснов** (менеджер по эффективности маркетинга, STADA), **Елена Леонова** (генеральный директор, Zinzino), **Дарья Луцко** (начальник отдела операционного маркетинга и СТМ, «Магнит Фарма»), **Мамука Михелашвили** (начальник отдела ассортиментного планирования, «Магнит Фарма»), **Светлана Науменко** (руководитель направления интернет-маркетинга, «Герофарм») и **Олег Фельдман** (сопредседатель направления Healthcare, Ipsos в России).

Позитивный тон дискуссии задал **Ованес Давидян**, назвавший 2020-й год домом возможностей для производителей БАД, чтобы заявить о себе и представить потребителям широкую линейку продукции, превентивная роль которой заключается в сохранении здоровья населения в непростое в эпидемиологическом плане время. **Елена Леонова**, в свою очередь, назвала распространенным заблуждением в отношении MLM-компаний мнение о навязывании ими потребителям своей продукции, в то время как продвижение строится главным образом на основе эффективности и результативности препаратов. **Марина Камаева**, говоря о 70-летнем положительном опыте компании Solgar, назвала главной его составляющей неизменность стратегии – работать ради потребителя и помнить о социально значимой роли компании, заключающейся в использовании нутриентов для поддержания здоровья людей вне зависимости от их возраста.

Вторая часть маркетинговой сессии, посвященная взаимодействию производителей БАД с аптечными сетями, а также аптечному маркетингу, началась с выступления **Олега Фельдмана**. Спикер поделился статистическими данными компании Ipsos относительно структуры мультиканального продвижения продукции БАД в аптеках, а также продвижения посредством взаимодействия с врачебным сообществом. По словам **Евгения Гордеева**, пандемия медленно, но верно меняет правила игры: если еще недавно наиболее востребованным каналом коммуникации для врача был медицинский представитель, то сегодня визиты МП не только не могут осуществляться на постоянной основе, но и не соответствуют на 100 % всем критериям современного источника информации, и им на смену приходит Digital. Рассуждая о возможностях аптечного продвижения, **Дарья Луцко** посоветовала новым производителям активнее сотрудничать с мелкими сетями, чтобы минимизировать риск инвестиций, а в дальнейшем, по мере накопления опыта, переходить к масштабированию бизнеса.

Компания infor-media Russia благодарит всех участников мероприятия за продуктивную дискуссию. Мы будем рады вновь видеть вас на Третьей ежегодной конференции «Что происходит на рынке БАД?» в 2021 году. Кроме этого, приглашаем вас принять участие в масштабных мероприятиях фармацевтической индустрии: XVI Международной конференции «Фармацевтический бизнес в России – 2021» (12 марта) и XVI Аптечном саммите «Эффективное управление аптечной сетью» (13 марта). Подробная информация о мероприятиях на сайте http://infor-media.ru/

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

Медиа-партнерство

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

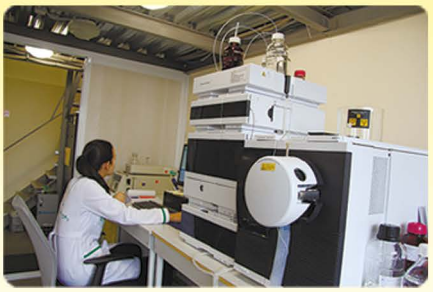
В рамках информационного сотрудничества мы предлагаем:

- *Публикации в печатном и электронном журнале*
  - Научные статьи
  - Рекламные статьи
  - Рекламные модули
- *Баннерная реклама на сайте*
  Размещение рекламных баннеров на сайте pharmjournal.ru
- *Публикации статей, новостей, мероприятий на сайте журнала*
- *e-mail-маркетинг (в базе 12000 + 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 ВАК, SCOPUS.

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

- ✓ Фармацевтического форума стран ЕАЭС и СНГ.
- ✓ Российского Фармацевтического Форума.
- ✓ GMP-конференции с международным участием.
- ✓ Конференции «Дженерики и биосимиляры в России и ЕАЭС».
- ✓ Выставки «IPhEB Russia».
- ✓ Международной конференции «Что происходит на фармацевтическом рынке?».
- ✓ Выставки «Аналитика Экспо».
- ✓ Форума Биотехмед.

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/10.33380/2305-2066-2021-10-1-31-36
УДК 615.277.3

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

PD-L1 как потенциальная мишень в противораковой терапии (обзор)

Н. Н. Андрусова[1]*, М. А. Колганова[2], А. В. Алешина[2], И. Е. Шохин[2]

1 – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86
2 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

***Контактное лицо:** Андрусова Надежда Николаевна. **E-mail:** nrychneva@mail.ru

ORCID: Н. Н. Андрусова – https://orcid.org/0000-0001-5038-6042; М. А. Колганова – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; А. В. Алешина – https://orcid.org/0000-0003-2611-501X; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 15.01.2021. **Статья принята в печать:** 15.02.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Рак является одним из самых тяжелых и распространенных заболеваний с высокой вероятностью летального исхода, поэтому поиск новых направлений и способов лечения раковых заболеваний с каждым годом приобретает все большую актуальность. За последние несколько десятков лет были достигнуты значительные успехи в иммунотерапии рака. При этом перспективным направлением иммуноонкологической терапии является блокирование взаимодействия рецептора программируемой клеточной смерти (PD-1) с его лигандом (PD-L1).

Текст. Взаимодействие PD-1/PD-L1 играет важную роль в отрицательной регуляции иммунной системы, защищая клетки и ткани организма хозяина от чрезмерного иммунного ответа. Однако данный механизм также используется опухолевыми клетками для подавления иммунного ответа организма хозяина. Обнаружение этого механизма положило начало разработке лекарственных препаратов, ингибирующих PD-1 или PD-L1, целью которых является усиление противоопухолевого иммунитета. При этом анти-PD-L1-препараты обладают потенциально меньшей токсичностью по сравнению с анти-PD-1. В настоящее время для применения FDA (Food and Drug Administration, США) одобрены ингибиторы PD-L1 Атезолизумаб, Дурвалумаб и Авелумаб. Данные лекарственные средства обладают достаточной эффективностью, подтвержденной клиническими исследованиями, однако применяются для очень ограниченного числа онкологических заболеваний. Потенциально перспективным лекарственным препаратом является BMS-936559, который прошел только первую стадию клинических испытаний. Однако иммуноонкологическая терапия ингибиторами PD-L1 сопряжена с возникновением большого числа тяжелых побочных эффектов, в том числе иммуноопосредованных, которые возникают из-за блокирования лигандов PD-L1, находящихся на здоровых клетках. Это стимулирует проведение дальнейших исследований, направленных на разработку новых лекарственных препаратов, лишенных отмеченных недостатков.

Заключение. Иммунотерапия злокачественных новообразований несет в себе огромный потенциал и открывает новые горизонты в лечении форм рака, рефрактерных к стандартным методам лечения. При этом разработка новых и усовершенствование существующих лекарственных препаратов-ингибиторов PD-L1 являются перспективными направлениями, определяющими траекторию борьбы с опухолевыми заболеваниями.

Ключевые слова: PD-L1-ингибитор, блокировка контрольных точек иммунитета, иммунотерапия рака, авелумаб, дурвалумаб, атезолизумаб, моноклональные антитела.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

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

Для цитирования: Андрусова Н. Н., Колганова М. А., Алешина А. В., Шохин И. Е. PD-L1 как потенциальная мишень в противораковой терапии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):31–36. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-31-36

PD-L1 as a Potential Target in Cancer Therapy (Review)

Nadezhda N. Andrusova[1]*, Maria A. Kolganova[2], Alexandra V. Aleshina[2], Igor E. Shohin[2]

1 – Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Russian Technological University", 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia
2 – LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

***Corresponding author:** Nadezhda N. Andrusova. **E-mail:** nrychneva@mail.ru

ORCID: Nadezhda N. Andrusova – https://orcid.org/0000-0001-5038-6042; Maria A. Kolganova – https://orcid.org/0000-0003-4568-1172; Alexandra V. Aleshina – https://orcid.org/0000-0003-2611-501X; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 15.01.2021. **Revised:** 15.02.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Cancer is one of the most serious and common diseases with a high level of mortality. Due to this reason the searching of new directions and methods of cancer treatment is becoming more and more important with each passing year. Significant advances in cancer immunotherapy have been reached over the past few decades. Moreover, an inhibition of the interaction between the programmed cell death receptor (PD-1) and its ligand (PD-L1), is sure to be perspective direction of the immuno-oncological therapy development.

Text. PD-1/PD-L1 interaction plays a pivotal role in negative regulation of immune system, that protects host's cells and tissues from the excessive immune response. However, it is also used by tumor cells to avoid the host's immune system. The discovery of this mechanism led to the development of inhibiting PD-1 or PD-L1 agents that enhance anti-tumor immunity. Meanwhile, anti-PD-L1 agents provide less toxicity in comparison with anti-PD-1 agents. FDA currently approved Atesolizumab, Durvalumab, and Avelumab PD-L1 inhibitors for cancer treatment. These agents demonstrated effective response during the clinical trials, however, they are used for a limited number of oncological diseases. In addition, BMS-936559 is a promising agent that had passed the first stage of the clinical trials. Nevertheless, immunotherapy involving PD-L1 inhibitors is closely related to a vast number of severe side effects including immune-mediated effects caused by the inhibition of PD-L1 ligands located on healthy cells. In these terms, the development of new agents deprived of these disadvantages is the reason for further studies.

© Андрусова Н. Н., Колганова М. А., Алешина А. В., Шохин И. Е., 2021
© Andrusova N. N., Kolganova M. A., Aleshina A. V., Shohin I. E., 2021

Conclusion. Immunotherapy in cancer uncovers new perspectives in treatment of refractory to standard therapies forms of cancer. And the development of new and improvement of existing PD-L1 blocking agents are of great importance in fighting against tumoral diseases.

Keywords: PD-L1 inhibitor, immune checkpoint blockade, cancer immunotherapy, atezolizumab, durvalumab, avelumab, monoclonal antibody.

Conflict of interest: no conflict of interest.

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

For citation: Andrusova N. N., Kolganova M. A., Aleshina A. V., Shohin I. E. PD-L1 as a potential target in cancer therapy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(1):31–36. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-31-36

ВВЕДЕНИЕ

Раковые заболевания по-прежнему занимают лидирующие позиции по числу смертельных случаев как в России, так и во всем мире. Поэтому разработка и усовершенствование методов лечения рака является актуальной задачей и приоритетным направлением исследований во многих странах.

За последние несколько десятилетий было разработано и оценено множество иммунотерапевтических подходов к лечению рака. И хотя результаты многих из этих ранних усилий были неутешительными, способность вызывать длительные ремиссии внушительных опухолей с использованием высоких доз интерлейкина-2 (HD-IL-2), интерферона α и вакцин тем не менее предоставила доказательства большого потенциала иммунотерапии [1, 2]. Дальнейшие исследования обеспечили более четкое понимание факторов, ограничивающих противоопухолевый иммунный ответ, что привело к разработке различных агентов, мишенями которых являются иммуностимулирующие и иммуносупрессорные пути. Одной из ключевых мишеней для лекарственных препаратов является лиганд белка-рецептора программируемой клеточной смерти PD-L1, участвующий в механизме индуцированной опухолью иммуносупрессии.

Данный обзор содержит подробную информацию о применяемых в настоящее время препаратах, мишенью которых является лиганд PD-L1.

Общая характеристика взаимодействия PD-1/PD-L1

PD-1 (рецептор программируемой клеточной смерти) представляет собой трансмембранный белок из семейства иммуноглобулинов. Рецептор PD-1 наравне с рецептором CTLA4 играет важную роль в отрицательной регуляции иммунной системы, ингибируя активность цитотоксических Т-лимфоцитов, что предотвращает возникновение аутоиммунной реакции и повреждений клеток собственного организма при воспалениях [3]. Он состоит из внеклеточного N-концевого IgV-подобного домена, трансмембранного домена и цитоплазматического конца, участвующего в передаче ингибирующего сигнала [4]. PD-1 экспрессируется на активированных клетках иммунитета, включая CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, моноциты, дендритные клетки, макрофаги, а также инфильтрирующие опухоль клетки [5]. Более того, PD-1 избирательно активируется в Т-клетках в ответ на постоянное воздействие антигенов. Таким образом, экспрессия PD-1 в Т-клетках является одним из маркеров истощения Т-лимфоцитов [6].

Известны два лиганда рецептора PD-1 – PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), которые принадлежат к семейству B7. PD-L1 экспрессируется в различных кроветворных, а также эндотелиальных и эпителиальных клетках [7]. PD-L2 имеет ограниченную экспрессию, в основном на активированных макрофагах и дендритных клетках [8]. Однако PD-L1 так же может экспрессироваться на опухолевых клетках и на инфильтрирующих опухоль клетках иммунной системы – лимфоидных и миелоидных, а также стромальных клетках, обуславливающих интеграцию опухоли [9]. Описываются многочисленные случаи экспрессии PD-L1 при различных видах рака, включая меланому, множественную миелому, лейкемию, глиобластому, а также рак желудка, почек, мочевого пузыря, кожи, молочных желез и легких [10–12]. При связывании лиганда PD-L1 опухолевой клетки с рецептором PD-1 Т-лимфоцита происходит угнетение цитотоксической активности Т-клеток посредством ингибирования пролиферации Т-лимфоцитов и продукции цитокинов. Дополнительно происходит индуцирование апоптоза инфильтрирующих опухоль Т-клеток [13]. Таким образом, взаимодействие PD-L1/PD-1 играет важную роль в механизме избегания опухолями иммунного ответа. Поэтому блокирование данного взаимодействия способствует прекращению опосредованного PD-L1/PD-1 подавления иммунного ответа и вызывает реактивацию противоопухолевого иммунитета, что по сути и является актуальной задачей иммунотерапии рака.

Лекарственные препараты-ингибиторы PD-L1

Иммуноонкологические препараты завоевывают все большее доверие среди врачей как новые методы лечения злокачественных новообразований. Ингибиторы PD-1/PD-L1-пути занимают особое место в имму-

нотерапии опухолей, поскольку оказываются эффективными при лечении онкологических заболеваний, не восприимчивых к стандартным методам лечения. Было высказано предположение, что выбор в качестве мишени лиганда PD-L1 может сопровождаться меньшей токсичностью, частично путем селективного модулирования иммунного ответа в микроокружении опухоли, что обусловливает большой интерес к его выбору в качестве мишени для лекарственных препаратов [14].

В настоящее время для системной терапии раковых заболеваний с местнораспространенными и метастатическими процессами Европейским обществом медицинской онкологии рекомендованы к применению лекарственные препараты-ингибиторы PD-L1 Атезолизумаб, Дурвалумаб и Авелумаб (таблица 1).

Атезолизумаб

Атезолизумаб – гуманизированные моноклональные антитела, иммуноглобулины класса G (IgG1) с видоизмененным Fc-фрагментом. Атезолизумаб непосредственно связывается с лигандом PD-L1 и блокирует его взаимодействие с рецептором PD-1 [15].

Препарат одобрен для лечения пациентов с местнораспространенной и метастатической уротелиальной карциномой при экспрессии PD-L1 ≥5 % на иммунокомпетентных клетках и при невозможности лечения Цисплатином [16]. Он показан при невозможности проведения любой платиносодержащей химиотерапии, независимо от уровня экспрессии PD-L1. Атезолизумаб назначается пациентам с прогрессированием заболевания в ходе или после окончания любой платиносодержащей химиотерапии в течение 12 месяцев после неоадъювантной или адъювантной химиотерапии [16]. Эффективность атезолизумаба доказана клиническими исследованиями, в которых частота объективного ответа составила 23 % и 25 % соответственно [17, 18].

Атезолизумаб применяется в комбинированной терапии немелкоклеточного рака легких вместе с Бевацизумабом, Паклитакселом, Карбоплатином и Наб-палитакселом в первой линии терапии и в монотерапии местнораспространенного или метастатического немелкоклеточного рака легких у взрослых пациентов [16]. При этом в сочетании с химиотерапией Атезолизумаб значительно снижает риск прогрессирования заболевания и смертность по сравнению с одной только химиотерапией [19].

В 2019 году FDA одобрено применение Атезолизумаба при комбинированной терапии неоперабельного местнораспространенного или метастатического тройного негативного рака молочной железы в первой линии терапии в комбинации с Наб-паклитакселом при наличии экспрессии PD-L1 ≥1 % на иммунокомпетентных клетках, инфильтрирующих ткань опухоли [16]. Клинические исследования показали, что применение Атезолизумаба в комбинации с Наб-паклитакселом снижает риск прогрессирования заболевания или смерти, а также увеличивает общую выживаемость пациентов почти на 9,5 месяцев по сравнению с монотерапией Наб-паклитакселом [20].

Проводятся клинические исследования, направленные на определение эффективности Атезолизумаба при раке почки [21].

Дурвалумаб

Лекарственный препарат Дурвалумаб (Имфинзи®) представляет собой человеческие моноклональные антитела – иммуноглобулины класса G (IgG1), которые блокируют связывание лиганда PD-L1 с рецептором PD-1, позволяя Т-лимфоцитам распознавать и уничтожать опухолевые клетки. При этом взаимодействие PD-1 с PD-L2 не затрагивается [22].

Препарат одобрен FDA для лечения взрослых пациентов с местнораспространенной и метастатической уротелиальной карциномой, наблюдаемой во вре-

Таблица 1. Лекарственные препараты-ингибиторы PD-L1

Table 1. PD-L1 inhibitors

Лекарственный препарат (МНН) **Medicinal product (INN)**	**Торговое наименование** **Trade name**	**Компания-производитель** **Manufacturing company**	**Применение** **Application**
Атезолизумаб (MPDL3280A) Atezolizumab (MPDL3280A)	Тецентрик® Tecentrik®	Roche	Немелкоклеточный рак легкого, уротелиальная карцинома, тройной негативный рак молочной железы Non-small cell lung cancer, urothelial carcinoma, triple negative breast cancer
Дурвалумаб (MEDI4736) Durvalumab (MEDI4736)	Имфинзи® Imfinzi®	AstraZeneca	Местнораспространенная и метастатическая уротелиальная карцинома, немелкоклеточный рак легкого Locally advanced and metastatic urothelial carcinoma, non-small cell lung cancer
Авелумаб (MSB0010718C) Avelumab (MSB0010718C)	Бавенсио® Bavencio®	Merck KgaA и Pfizer	Карцинома Меркеля, рак почки, уротелиальная карцинома Merkel carcinoma, kidney cancer, urothelial carcinoma

мя прохождения платиносодержащей химиотерапии и прогрессирующей после ее прохождения [23]. Клинические исследования продемонстрировали, что Дурвалумаб достаточно безопасен и обладает значительной клинической активностью, в том числе и у пациентов, которые подвергались интенсивному предварительному лечению [24, 25]. Также препарат одобрен для лечения взрослых пациентов с неоперабельной третьей стадией немелкоклеточного рака легких, не прогрессирующего после прохождения платиносодержащей химиотерапии и лучевой терапии, и в сочетании с эстопозодом и карбоплатином или цисплатином как первая линия лечения пациентов с обширным мелкоклеточным раком легких [23]. Клинические исследования продемонстрировали эффективность лекарственного средства у пациентов с неоперабельным немелкоклеточным раком легкого без дальнейшего прогрессирования заболевания после химиолучевой терапии [22, 26]. Прием дурвалумаба в сочетании с лучевой терапией способствовал увеличению продолжительности жизни пациентов по сравнению с плацебо.

Авелумаб

Авелумаб – полностью человеческие моноклональные антитела класса IgG1, которые, в отличие от других препаратов, не только блокируют взаимодействие PD-1/PD-L1, но и влияют на антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность, что вызывает лизис опухолевых клеток [27].

Применение авелумаба в качестве лекарственного препарата для лечения карциномы Меркеля у взрослых пациентов и детей от 12 лет основано на клинических исследованиях, объективная частота ответа в которых составила 29,5 % с длительностью ответа от 2,8 до 14,6 месяцев (медиана не установлена) [28, 29]. Препарат обладает эффективностью и значительно увеличивает продолжительность жизни пациентов с прогрессирующей во время или после прохождения платиносодержащей химиотерапии уротелиальной карциномой, а также в комбинированной терапии вместе с Акситинибом в отношении пациентов с прогрессирующим раком почки [30, 31].

Перспективным направлением применения авелумаба является лечение рака груди и рецидивирующего и рефрактерного рака яичников [32–34].

BMS-936559

Лекарственный препарат BMS-936559, который является продуктом компании Bristol-Myers Squibb, представляет собой полностью человеческие антитела, иммуноглобулины IgG4 с высоким сродством к молекуле PD-L1. На сегодняшний момент проведена только первая стадия клинических испытаний данного препарата на пациентах с меланомой, раком почки и немелкоклеточным раком легкого [35, 36]. BMS-936559 обладает достаточным потенциалом, чтобы занять свое место среди других препаратов, блокирующих контрольные точки иммунитета, однако о намерениях проводить дальнейшие клинические исследования данного препарата компанией-производителем не сообщалось.

Перспективы развития анти-PD-L1-иммунотерапии рака

Несмотря на перспективность терапии с использованием иммуноонкологических препаратов-ингибиторов контрольных точек иммунитета их применение ограничено из-за ряда сложностей.

Прежде всего, лиганд рецептора программируемой клеточной смерти экспрессируется не только на клетках опухоли, но и на здоровых клетках организма-хозяина, что является защитной реакцией организма от чрезмерного повреждения, вызванного Т-клеточным воспалением. В этом контексте необходимо, чтобы иммунотерапия рака была конкретно сосредоточена на сайтах самой опухоли, а не на системной активации иммунной системы. Эта селективность может быть достигнута путем идентификации иммуномодулирующих мишеней, находящихся непосредственно в месте опухоли. Дифференцированный подход заключается в добавлении компонентов, мишенью которых является опухоль, к активаторам системного иммунного ответа, что ограничит место их действия [37].

Другой немаловажной особенностью применения иммуноонкологической терапии является тот факт, что эффективность препаратов данного типа была доказана для очень ограниченного числа типов рака, тогда как при большинстве эпителиальных злокачественных образований длительного ответа не наблюдается.

И наконец, иммунотерапия тесно сопряжена с возникновением большого спектра побочных эффектов, таких как усталость, зуд, сыпь, тошнота, диабет первого типа, пневмония и других [38]. Также ингибиторы контрольных точек могут вызывать иммуноопосредованные побочные эффекты почти в любой системе органов. Большинство из них обратимо, за исключением эффектов со стороны эндокринной системы, и летальные исходы возникают редко. Клинические исследования показали, что при лечении рака блокаторами контрольных точек иммунитета у 21 % пациентов возникли иммуноопосредованные побочные эффекты, среди 28 пациентов наблюдался один летальный исход из-за пневмонита и колита [39]. Кроме того, использование моноклональных антител может обуславливать иммуногенность препарата, что, в свою очередь, также может вызывать развитие побочных реакций и снижать клиническую эффективность [40].

Уменьшение частоты возникновения побочных эффектов, сопряженное с детальным изучением влияния анти-PD-L1-препаратов на функции организма, является одной из наиболее приоритетных для изучения задач.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия рака открывает новые возможности в лечении злокачественных новообразований. Изучение механизма взаимодействия PD-1/PD-L1, а также разработка новых и усовершенствование существующих анти-PD-L1-препаратов несет в себе огромный потенциал для терапии опухолей, невосприимчивых к стандартным методам лечения.

FDA одобрено к применению три лекарственных препарата данного типа: Атезолизумаб, Авелумаб и Дурвалмаб, что позволило увеличить эффективность терапии пациентов с многократными рецидивами заболевания.

Несмотря на то, что эффективность анти-PD-L1-терапии подтверждена клиническими исследованиями в отношении многих видов рака, до сих пор актуальным направлением исследований является изучение эффективности лекарственных препаратов при других онкологических заболеваниях, что представляет перспективу расширения спектра их применения. Не менее важными направлениями являются разработка новых методов таргетной доставки существующих препаратов, а также изучение и поиск способов сокращения числа побочных эффектов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kantoff P. W., Higano C. S., Shore N. D., Berger E. R., Small E. J., Penson D. F., Redfern C. H., Ferrari A. C., Dreicer R., Sims R. B., Xu Y., Frohlich M. W., Schellhammer P. F. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(5):411–422. DOI: 10.1056/NEJMoa1001294.
2. Canil C., Hotte S., Mayhew L. A., Waldron T. S., Winquist E. Interferon-alfa in the treatment of patients with inoperable locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: a systematic review. *Can. Urol. Assoc. J.* 2010;4(3):201–208. DOI: 10.5489/cuaj.853.
3. Francisco L. M., Sage P. T., Sharpe A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236(1):219–242. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
4. Zhang X, Schwartz J.-C. D., Guo X., Bhatia S., Cao E., Chen L., Zhang Z.-Y., Edidin M. A., Nathenson S. G., Almo S. C. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity.* 2004;20(3):337–347. DOI: 10.1016/S1074-7613(04)00051-2.
5. Ji M., Liu Y., Li Q., Li X.-D., Zhao W.-Q., Zhang H., Zhang X., Jiang J.-T., Wu C.-P. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *Journal of Translational Medicine.* 2015;13(1):5. DOI: 10.1186/s12967-014-0373-0.
6. Dong Y., Sun Q., Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(2):2171–2186. DOI: 10.18632/oncotarget.13895.
7. Topalian S. L., Drake C. G., Pardoll D. M. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2012;24(2):207–212. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009.
8. Liu J., Hamrouni A., Wolowiec D., Coiteux V., Kuliczkowski K., Hetuin D., Saudemont A., Quesnel B. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296–304. DOI: 10.1182/blood-2006-10-051482.
9. Latchman Y., Wood C. R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A. J., Brown J. A., Nunes R., Greenfield E. A., Bourque K., Boussiotis V. A., Carter L. L., Carreno B. M., Malenkovich N., Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A. H., Freeman G. J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology.* 2001;2(3):261–268. DOI: 10.1038/85330.
10. Boland J. M., Kwon E. D., Harrington S. M., Wampfler J. A., Tang H., Yang P., Aubry M. C. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clinical Lung Cancer.* 2013;14(2):157–163. DOI: 10.1016/j.cllc.2012.05.006.
11. Huang Y., Zhang S.-D., McCrudden C., Chan K.-W., Lin Y., Kwok H.-F. The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. *Oncology Reports*. 2015;33(6):3075–3084. DOI: 10.3892/or.2015.3933.
12. Nduom E. K., Wei J., Yaghi N. K., Huang N., Kong L.-Y., Gabrusiewicz K., Ling X., Zhou S., Ivan C., Chen J. Q., Burks J. K., Fuller G. N., Calin G. A., Conrad C. A., Creasy C., Ritthipichai K., Radvanyi L., Heimberger A. B. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro oncology.* 2016;18(2):195–205. DOI: 10.1093/neuonc/nov172.
13. Barber D. L., Wherry E. J., Masopust D., Zhu B., Allison J. P., Sharpe A. H., Freeman G. J., Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682–687. DOI: 10.1038/nature04444.
14. Sunshine J., Taube J. M. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology.* 2015;23:32–38. DOI: 10.1016/j.coph.2015.05.011.
15. McDermott D. F., Sosman J. A., Sznol M., Massard C., Gordon M. S., Hamid O., Powderly J. D., Infante J. R., Fassò M., Wang Y. V., Zou W., Hegde P. S., Fine G. D., Powles T. Atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in metastatic renal cell carcinoma: long-term safety, clinical activity, and immune correlates from a phase Ia study. *J Clin Oncol.* 2016;34(8):833–842. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.7421.
16. TECENTRIQ highlights of prescribing information. U.S. Food and Drug Administration [Internet]. Drug Approvals and Databases. 2019. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/761034s018lbl.pdf. Accessed: 19.05.2020.
17. Balar A. V., Galsky M. D., Rosenberg J. E., Powles T., Petrylak D. P., Bellmunt J., Loriot Y., Necchi A., Hoffman-Censits J., Perez-Gracia J. L., Dawson N. A., van der Heijden M. S., Dreicer R., Srinivas S., Retz M. M., Joseph R. W., Drakaki A., Vaishampayan U. N., Sridhar S. S., Quinn D. I., Durán I., Shaffer D. R., Eigl B. J., Grivas P. D., Yu E. Y., Li S., Kadel E. E., Boyd Z., Bourgon R., Hegde P. S., Mariathasan S., Thåström A., Abidoye O. O., Fine G. D., Bajorin D. F. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet.* 2017;389(10064):67–76. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32455-2.
18. Perez-Gracia J. L., Loriot Y., Rosenberg J. E., Powles T., Necchi A., Hussain S. A., Morales-Barrera R., Retz M. M., Niegisch G., Durán I., Théodore C., Grande E., Shen X., Wang J., Nelson B., Derleth C. L., van der Heijden M. S. Atezolizumab in Platinum-treated Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma: Outcomes by Prior Number of Regimens. *European Urology.* 2018;73(3):462–468. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.11.023.
19. Horn L., Mansfield A. S., Szczęsna A., Havel L., Krzakowski M., Hochmair M. J., Huemer F., Losonczy G., Johnson M. L., Nishio M., Reck M., Mok T., Lam S., Shames D. S., Liu J., Ding B., Lopez-Chavez A., Kabbinavar F., Lin W., Sandler A., Liu S. V. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(23):2220–2229. DOI: 10.1056/NEJMoa1809064.

20. Schmid P., Adams S., Rugo H. S., Schneeweiss A., Barrios C. H., Iwata H., Diéras V., Hegg R., Im S.-A., Shaw Wright G., Henschel V., Molinero L., Chui S. Y., Funke R., Husain A., Winer E. P., Loi S., Emens L. A. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(22):2108–2121. DOI: 10.1056/NEJMoa1809615.
21. McDermott D. F., Sosman J. A., Sznol M., Massard C., Gordon M. S., Hamid O., Powderly J. D., Infante J. R., Fassò M., Wang Y. V., Zou W., Hegde P. S., Fine G. D., Powles T. Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(8): 833–842. DOI: 10.1200/jco.2015.63.7421.
22. Antonia S. J., Villegas A., Daniel D., Vicente D., Murakami S., Hui R., Yokoi T., Chiappori A., Lee K. H., de Wit M., Cho B. C., Bourhaba M., Quantin X., Tokito T., Mekhail T., Planchard D., Kim Y.-C., Karapetis C. S., Hiret S., Ostoros G., Kubota K., Gray J. E., Paz-Ares L., de Castro Carpeño J., Wadsworth C., Melillo G., Jiang H., Huang Y., Dennis P. A., Özgüroğlu M. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1919–1929. DOI: 10.1056/NEJMoa1709937.
23. AstraZeneca Imfinzi (durvalumab): highlights of prescribing information. U.S. Food and Drug Administration [Internet]. Drug Approvals and Databases. 2017. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/761069s000lbl.pdf. Accessed: 19.05.2020.
24. Massard C., Gordon M. S., Sharma S., Rafii S., Wainberg Z. A., Luke J., Curiel T. J., Colon-Otero G., Hamid O., Sanborn R. E., O'Donnell P. H., Drakaki A., Tan W., Kurland J. F., Rebelatto M. C., Jin X., Blake-Haskins J. A., Gupta A., Segal N. H. Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(26): 3119–3125. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.9761.
25. Powles T., O'Donnell P. H., Massard C., Arkenau H.-T., Friedlander T. W., Hoimes C. J., Lee L. L., Ong M., Sridhar S. S., Vogelzang N. J., Fishman M. N., Zhang J., Srinivas S., Parikh J., Antal J., Jin X., Gupta A. K., Ben Y., Hahn N. M. Efficacy and safety of durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: updated results from a phase 1/2 open-label study. *JAMA Oncology*. 2017;3(9):e172411. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.2411.
26. Antonia S. J., Villegas A., Daniel D., Vicente D., Murakami S., Hui R., Kurata T., Chiappori A., Lee K. H., de Wit M., Cho B. C., Bourhaba M., Quantin X., Tokito T., Mekhail T., Planchard D., Kim Y.-C., Karapetis C. S., Hiret S., Ostoros G., Kubota K., Gray J. E., Paz-Ares L., de Castro Carpeño J., Faivre-Finn C., Reck M., Vansteenkiste J., Spigel D. R., Wadsworth C., Melillo G., Taboada M., Dennis P. A., Özgüroğlu M. Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342–2350. DOI: 10.1056/NEJMoa1809697.
27. Boyerinas B., Jochems C., Fantini M., Heery C. R., Gulley J. L., Tsang K. Y., Schlom J. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunology Research*. 2015;3(10):1148–1157. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0059.
28. FDA approves first treatment for rare form of skin cancer. U.S. Food and Drug Administration [Internet]. Drug Approvals and Databases. 2017. Available at: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-rare-form-skin-cancer. Accessed: 19.05.2020.
29. Kaufman H., Russell J. S., Hamid O., Bhatia S., Terheyden P., D'Angelo S. P., Shih K. C., Lebbe C., Linette G. P., Milella M., Brownell I., Lewis K. D., Lorch J. H., Chin K. M., Mahnke L., von Heydebreck A., Cuillerot J.-M., Nghiem P. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with metastatic Merkel cell carcinoma previously treated with chemotherapy: Results of the phase 2 JAVELIN Merkel 200 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15):9508. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.9508.
30. Apolo A. B., Infante J. R., Balmanoukian A., Patel M. R., Wang D., Kelly K., Mega A. E., Britten C. D., Ravaud A., Mita A. C., Safran H., Stinchcombe T. E., Srdanov M., Gelb A. B., Schlichting M., Chin K., Gulley J. L. Avelumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(19):2117–2124. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.6795.
31. Motzer R. J., Penkov K., Haanen J., Rini B., Albiges L., Campbell M. T., Venugopal B., Kollmannsberger C., Negrier S., Uemura M., Lee J. L., Vasiliev A., Miller W. H., Gurney H., Schmidinger M., Larkin J., Atkins M. B., Bedke J., Alekseev B., Wang J., Mariani M., Robbins P. B., Chudnovsky A., Fowst C., Hariharan S., Huang B., di Pietro A., Choueiri T. K. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(12):1103–1115. DOI: 10.1056/NEJMoa1816047.
32. Dirix L. Y., Takacs I., Jerusalem G., Nikolinakos P., Arkenau H. T., Forero-Torres A., Boccia R., Lippman M. E., Somer R., Smakal M., Emens L. A., Hrinczenko B., Edenfield W., Gurtler J., von Heydebreck A., Grote H. J., Chin K., Hamilton E. P. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast cancer research and treatment*. 2018;167(3):671–686. DOI: 10.1007/s10549-017-4537-5.
33. Disis M. L., Patel M. R., Pant S., Infante J. R., Lockhart A. C., Kelly K., Beck J. T., Gordon M. S., Weiss G. J., Ejadi S., Taylor M. H., von Heydebreck A., Chin K. M., Cuillerot J.-M., Gulley J. L. Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with previously treated, recurrent or refractory ovarian cancer: A phase Ib, open-label expansion trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(15):5509. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.5509.
34. Disis M. L., Patel M. R., Pant S., Hamilton E. P., Lockhart A. C., Kelly K., Beck J. T., Gordon M. S., Weiss G. J., Taylor M. H., Chaves J., Mita A. C., Chin K. M., von Heydebreck A., Cuillerot J.-M., Gulley J. L. Avelumab (MSB0010718C; anti-PD-L1) in patients with recurrent/refractory ovarian cancer from the JAVELIN Solid Tumor phase Ib trial: Safety and clinical activity. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15):5533. DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.5533.
35. Tykodi S. S., Brahmer J. R., Hwu W.-J., Chow L. Q., Topalian S. L., Hwu P., Odunsi K., Camacho L. H., Kauh J. S., Pitot H. C., Hamid O., Pardoll D. M., Agrawal S., Parker S., Goldberg S., Gupta A. K., Wigginton J. PD-1/PD-L1 pathway as a target for cancer immunotherapy: Safety and clinical activity of BMS-936559, an anti-PD-L1 antibody, in patients with solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(15):2510. DOI: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.2510.
36. Brahmer J. R., Tykodi S. S., Chow L. Q. M., Hwu W.-J., Topalian S. L., Hwu P., Drake C. G., Camacho L. H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H. C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K., Chen S., Salay T. M., Alaparthy S., Grosso J. F., Korman A. J., Parker S. M., Agrawal S., Goldberg S. M., Pardoll D. M., Gupta A., Wigginton J. M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2455–2465. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694.
37. Chen L., Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9): 3384–3391. DOI: 10.1172/JCI80011.
38. Naidoo J., Page D. B., Li B. T., Connell L. C., Schindler K., Lacouture M. E., Postow M. A., Wolchok J. D. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology*. 2015;26(12):2375–2391. DOI: 10.1093/annonc/mdv383.
39. Bashey A., Medina B., Corringham S., Pasek M., Carrier E., Vrooman L., Lowy I., Solomon S. R., Morris L. E., Holland H. K., Mason J. R., Alyea E. P., Soiffer R. J., Ball E. D. CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;113(7):1581–1588. DOI: 10.1182/blood-2008-07-168468.
40. Putnam W. S., Prabhu S., Zheng Y., Subramanyam M., Wang Y.-M. C. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(10):509–516. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.07.001.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-37-47
УДК 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

Подходы к разработке препарата низкодозированного налтрексона в форме спрея назального (обзор)

Ю. М. Домнина[1,2]*, В. В. Суслов[1,2], С. А. Кедик[1,2], П. О. Волкова[1]

1 – ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ 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; П. О. Волкова – https://orcid.org/0000-0002-4614-6983.

Статья поступила: 03.11.2020. **Статья принята в печать:** 10.12.2020. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Налтрексона гидрохлорид относится к антагонистам μ-опиоидных рецепторов и широко применяется для лечения алкогольной и наркотической зависимостей в пероральной дозе 50 мг/сут. Также он является блокатором других рецепторов – опиоидного фактора роста и толл-подобного рецептора, что особенно проявляется при дозах 1,5–5 мг/сут и позволяет использовать его для лечения заболеваний, связанных различным образом с нарушением иммунитета.

Текст. На сегодняшний день имеется значительное количество данных, свидетельствующих об эффективности налтрексона гидрохлорида, вводимого перорально в дозах от 1,5 до 5,0 мг в сутки, для лечения социально значимых заболеваний, таких как СПИД, онкологические заболевания, аутизм, рассеянный склероз и др. Однако на фармацевтическом рынке до сих пор отсутствует лекарственный препарат, обеспечивающий такие дозы. В связи с тем, что пероральное введение налтрексона сопряжено с его печёночным метаболизмом первого прохода и образованием значительных количеств веществ, способных вызывать побочные нервно-психические эффекты и желудочно-кишечные расстройства, а также возможным взаимодействием налтрексона и его метаболитов с другими лекарственными препаратами, которые в больших количествах применяют при терапии указанных заболеваний, создание парентеральной лекарственной формы является актуальной задачей.

Заключение. В обзоре представлены современные исследования в области применения низкодозированного налтрексона, механизмы его действия и рассмотрены возможные области применения в медицинской практике. Отмечены недостатки перорального применения и рассмотрен альтернативный путь введения – интраназальный. Подходы к разработке готовой лекарственной формы – спрея назального – реализуются при подборе оптимального содержания активного вещества и вспомогательных компонентов препарата. Наиболее перспективно создание препарата на основе термообратимых полимеров с содержанием налтрексона гидрохлорида до 3,0 %.

Ключевые слова: низкие дозы налтрексона, механизм действия, интраназальное введение.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы осуществляли поиск литературы, принимали участие в ее систематизации и анализе.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Волкова П. О. Подходы к разработке препарата низкодозированного налтрексона в форме спрея назального. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):37–47. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-37-47

Approaches to the Development of a Low-dose Naltrexone Preparation in the Form of a Nasal Spray (Review)

Yuliya M. Domnina[1,2]*, Vasiliy V. Suslov[1,2], Stanislav A. Kedik[1,2], Polina O. Volkova[1]

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; Vasiliy V. Suslov – https://orcid.org/0000-0002-9578-2492; Stanislav A. Kedik – https://orcid.org/0000-0003-2610-8493; Polina O. Volkova – https://orcid.org/0000-0002-4614-6983.

Received: 03.11.2020. **Revised:** 10.12.2020. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Naltrexone hydrochloride belongs to μ-opioid receptor antagonists and is widely used in the treatment of alcohol and drug addiction at an oral dose of 50 mg/day. It is also a blocker of other receptors – opioid growth factor and Toll-like factor, which is especially evident at doses of 1.5–5 mg/day. This allows it to be used to treat diseases associated with impaired immunity.

Text. To date, there is a significant amount of data indicating the effectiveness of naltrexone hydrochloride administered orally in doses from 1.5 to 5.0 mg per day for the treatment of significant diseases such as AIDS, cancer, autism, multiple sclerosis, etc. However, on the pharmaceutical market still lacks a drug that provides such doses. Due to the fact that oral administration of naltrexone is associated with its first-pass hepatic metabolism and the formation of significant amounts of substances that cause side effects of neuropsychiatric effects and gastrointestinal disorders, as well as the possible effect of naltrexone and its metabolites by other drugs, which in large amounts are used for these diseases, the creation of a parenteral dosage form is relevant.

Conclusion. The review presents current research in the field of low-dose naltrexone application, its mechanisms of action, and considers possible areas of application in medical practice. The disadvantages of oral administration are noted and an alternative route of administration such as intranasal is considered. Approaches to the development of a finished dosage form – nasal spray, are implemented when selecting the optimal content of the active substance and auxiliary components of the drug. The most promising is the creation of a drug based on thermoreversible polymers with a naltrexone hydrochloride content of up to 3,0 %.

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Волкова П. О., 2021
© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Volkova P. O., 2021

Keywords: low-dose naltrexone, mechanism of action, intranasal administration.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors searched the literature, took part in its systematization and analysis.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Volkova P. O. Approaches to the development of a low-dose naltrexone preparation in the form of a nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):37–47. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-37-47

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексон – блокатор опиоидных рецепторов – был синтезирован в 60-х годах прошлого столетия [1]. С 1984 года налтрексон широко применяется для лечения алкогольной и наркотической зависимостей [2]. Для этих целей используются пероральные таблетки и капсулы налтрексона гидрохлорида в дозе 50 мг/сут, а также пролонгированные инъекционная (Вивитрол, Алкермес, Инк., США) [3–5] и имплантационная формы (Продектсон, ЗАО «Эхо НПК», Россия) [6], обеспечивающие терапевтический эффект в течение одного месяца и более.

В 1980-х годах доктор Бихари впервые применил налтрексона гидрохлорид в дозах от 1,5 мг до 3 мг в качестве дополнительной терапии синдрома приобретенного иммунодефицита, вследствие чего в экспериментальную клиническую практику был введён низкодозированный налтрексон (НДН, LDN, low-dose naltrexone) [7]. Он активно используется в качестве метода альтернативной медицины и применяется для лечения различных заболеваний среди его сторонников и энтузиастов.

В последние годы научный интерес к низкодозированному налтрексону значительно возрос и были опубликованы экспериментальные данные его применения для лечения различных социально значимых заболеваний, таких как СПИД, онкологические заболевания, аутизм, рассеянный склероз и др. Публикации охватывают различные типы источников, начиная с первоначальных отчетов о единичных случаях [8–10] и заканчивая рандомизированными контролируемыми исследованиями [11, 12].

Однако несмотря на наличие положительных результатов ряда исследований, до настоящего времени НДН не получил официального одобрения и его зарегистрированные препараты отсутствуют.

Следует отметить, что пероральный способ введения НДН имеет свои недостатки. Одним из основных является короткий период полувыведения (4 ч) и высокая степень метаболизма налтрексона в результате первого прохода через печень [13, 14]. Образующиеся продукты метаболизма могут вызывать побочные нервно-психические эффекты и желудочно-кишечные расстройства [15, 16]. Побочные эффекты также могут быть усилены возможным взаимодействием налтрексона и его метаболитов с другими лекарственными препаратами, которые в больших количествах применяют при терапии упомянутых ранее заболеваний. Всё это делает актуальным поиск других, более безопасных путей введения НДН.

Известно, что интраназальное введение позволяет избежать метаболизма первого прохода и обеспечивает высокую биодоступность вводимого препарата [17, 18]. Это делает целесообразным создание назальной лекарственной формы НДН с целью её дальнейшего изучения в качестве препарата для терапии заболеваний, связанных различным образом с нарушениями иммунитета.

Среди назальных форм выделяют капли, спреи, мази и гели назальные. Из перечисленных форм спрей назальный – это наиболее удобная в повседневном использовании лекарственная форма. Общим недостатком капель и спреев, в отличие от мазей и гелей, является возможность их вытекания из полости носа. В связи с этим для повышения комфортности применения целесообразно разрабатывать спреи, способные к гелеобразованию после введения в полость носа.

В статье рассмотрены современные представления о механизмах действия низкодозированного налтрексона, результаты его применения для лечения различных заболеваний и некоторые подходы к созданию спрея назального налтрексона гидрохлорида.

1. Механизм действия низкодозированного налтрексона

В настоящее время выделяют несколько объектов воздействия и предложены несколько механизмов действия налтрексона (рисунок 1) при его введении в дозе от 1 до 5 мг/сутки, которые объясняют эффективность при различных заболеваниях.

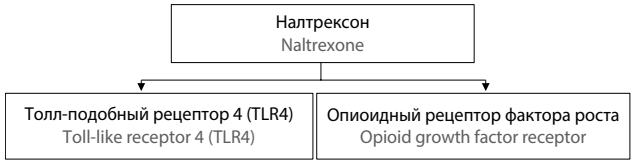


Рисунок 1. Объекты воздействия налтрексона

Figure 1. Targets of naltrexone

1.1. TLR4-опосредованный механизм

При введении в низких дозах налтрексон действует как глиальный модулятор [19, 20]. Он специфически связывается с толл-подобным рецептором 4 (TLR4) и блокирует его [21–23]. В результате ингибируется выработка противовоспалительных цитокинов интерлейкина (IL)-6, фактора некроза опухоли (TNF)-альфа, а также оксида азота, который способствует сенсибилизации боли посредством обработки ноцицептивных сигналов. [24].

1.2. OGFr-опосредованный механизм действия налтрексона

Опиоидный рецептор фактора роста, находящийся на ядерной мембране клетки, передает положительный сигнал в мозг при стимулировании его эндогенными лигандами (мет-энкефалином), тогда как при воздействии налтрексона на данный рецептор прохождение сигнала блокируется. Помимо данного эффекта, блокада опиоидных рецепторов приводит к возникновению механизма отрицательной обратной связи. Данный механизм включает компенсаторный рост числа опиоидных рецепторов факторов роста, увеличивает их чувствительность и приводит к повышению содержания мет-энкефалинов. Так как связь в комплексе «рецептор-налтрексон» сильнее связи «рецептор-стимулятор», то мет-энкефалины не могут связаться с рецептором, в результате чего происходит их накопление. Через несколько часов налтрексон метаболизируется и в организме увеличивается число связанных комплексов опиоидных рецепторов факторов роста с мет-энкефалинами, их естественными лигандами.

Связанный комплекс интегрируется в стенку мембраны, а затем благодаря высокой липофильности проникает внутрь клетки и ядра. В ядре клетки данный комплекс запускает процесс пролиферации клетки. Так как за время блокады рецепторов налтрексоном их общее количество на поверхности клеток резко повысилось, то, соответственно, увеличивается и дальнейшее число комплексов «рецептор-мет-энкефалин» (рисунок 2).

Периодическая блокада, вызываемая низкими дозами налтрексона, назначаемая один раз в день, приводит к компенсаторному усилению в производстве

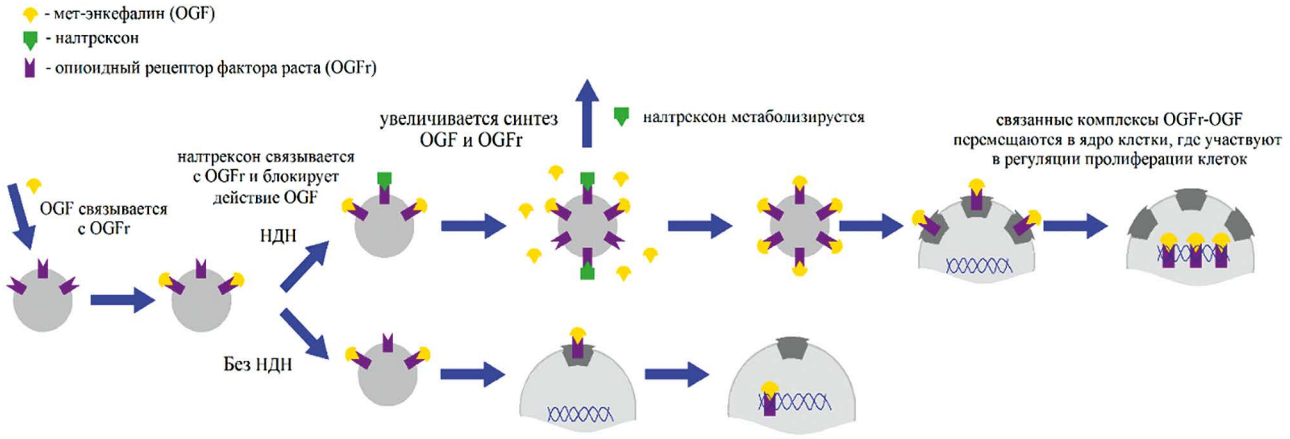


Рисунок 2. Механизм действия налтрексона гидрохлорида

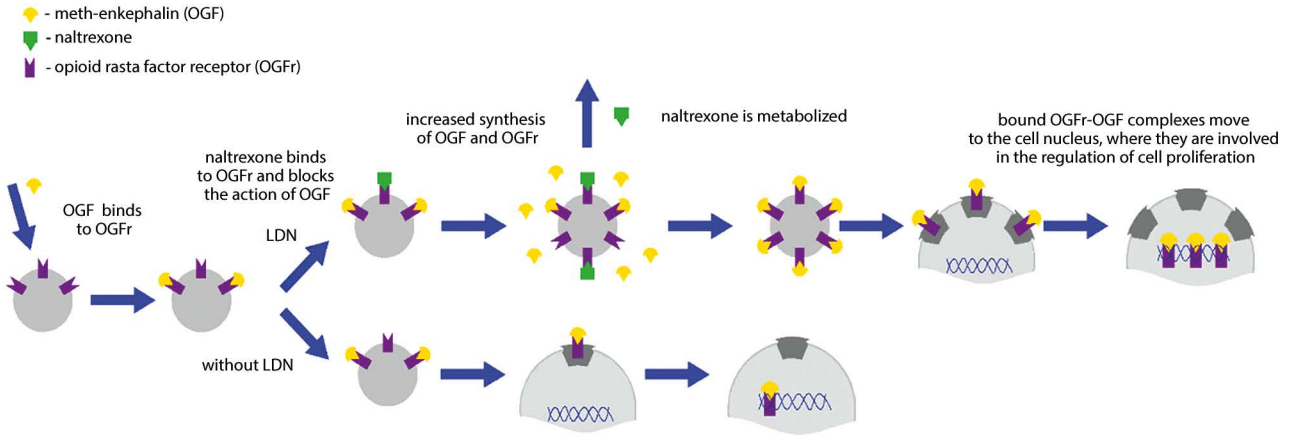


Figure 2. Mechanism of action of naltrexone hydrochloride

пептидов и рецепторов, которые в конечном счете ингибируют клеточную пролиферацию [25–29].

Обратный эффект имеет постоянная блокада рецептора опиоидного фактора роста, которая приводит к усилению клеточного роста, что нежелательно в случае опухолей, но было экспериментально использовано для заживления ран или поврежденной роговицы [30].

1.3. Различие в фармакологическом действии стереоизомеров налтрексона

Налтрексон является оптически активным соединением (рисунок 3).

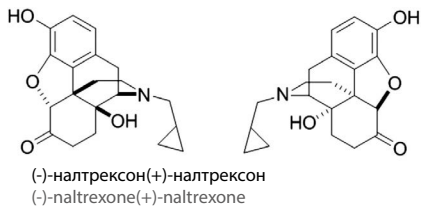


Рисунок 3. Связь терапевтического действия и механизма

Figure 3. Relationship between therapeutic action and mechanism

Проведенные исследования показали наличие стереоселективности у мишеней, на которые действует низкодозированный налтрексон. Так, опиоидные рецепторы являются селективными для (–)-изомеров, тогда как толл-подобный рецептор 4 не обладает такой селективностью [21]. Таким образом, (+)-налтрексон будет воздействовать исключительно на толл-подобный рецептор 4, что позволит уменьшить спектр действия препарата за счёт исключения эндогенной опиоидной регуляции.

2. Связь терапевтического действия налтрексона и механизма

Терапевтическую активность НДН в отношении различных заболеваний связывают с каждым из приведенных механизмов или их совокупностью.

2.1. Сахарный диабет первого типа

НДН подавляет пролиферацию лимфоцитов путем рассмотренного выше механизма блокады опиоидных рецепторов фактора роста и дополнительного увеличения уровня экспрессии TLR4. Данный тип рецепторов участвует в целом ряде механизмов передачи внутриклеточных сигналов, в частности защиты клетки от аутоиммунного захвата. Так как сахарный диабет первого типа является аутоиммунным заболеванием, при котором по причине роста клеток, отвечающих за распознавание и захват, снижается количество бета-клеток поджелудочной железы, то применение НДН может являться перспективным путем развития терапии [31, 32].

2.2. Воспалительные заболевания кишечника

Было проведено большое количество исследований по оценке использования налтрексона при воспалительном заболевании кишечника [33–36]. Для терапии данного ряда заболеваний используются два основных аспекта механизмов действия НДН – способность снижать пролиферацию клеток при аутоиммунных заболеваниях и уменьшать выраженность воспаления. Так как основным путем терапии в настоящее время является применение антибактериальных стероидных лекарственных препаратов, то лечение небольшими дозировками налтрексона способно повысить безопасность и переносимость терапии.

2.3. СПИД

Исследования показали, что содержание эндогенных опиоидов (энкефалинов, эндорфинов) у пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита значительно ниже, чем в плазме крови здорового человека. Использование НДН способно восстанавливать требуемый для правильной хемотаксической регуляции уровень энкефалинов, а экспрессия TLR4 приводит к увеличению уровня антибактериальной защиты [37].

2.4. Онкологические заболевания

На данный момент лечение онкологических заболеваний – самое развивающееся направление применения НДН по причине целого ряда эффектов: ингибирование пролиферации клеток приводит к снижению роста опухолевой ткани, повышение синтеза проапоптических белков обуславливает рост иммунного ответа и захвата клетками иммунной системы раковых клеток, параллельное увеличение способности организма сопротивляться оппортунистическим инфекциям благодаря росту числа TLR4, повышение эффективности химиотерапии из-за роста чувствительности к цитотоксическим лекарственным препаратам [38–40].

2.5. Воспалительные заболевания ЦНС

Перспективным направлением использования НДН являются такие заболевания ЦНС, как рассеянный склероз и аутизм, в механизме развития которых установлено воспалительное звено [41]. Процессы воспаления приводят к повышению уровня NO *in vivo*, что сопровождается демиелинизацией волокон и ухудшением проводимости сигналов. НДН снижает уровень индуцируемой оксидазы и таким образом снижает воспаление, препятствует дальнейшему разрушению миелина.

3. Применение НДН в клинической медицине

На сегодняшний день в литературе опубликовано значительное количество данных, которые подтверждают перспективность применения НДН в клинической практике. В обзорных статьях [42–46] обобщены

результаты изучения возможности применения низкодозированного налтрексона для лечения рассеянного склероза, комплексного регионального болевого синдрома, фибромиалгии, заболеваний желудочно-кишечного тракта (в частности, болезни Крона), онкологических заболеваний, заболеваний кожи, хронического болевого синдрома и некоторых других заболеваний.

Также в настоящее время проведено или находится на разной стадии проведения более 20 клинических исследований различного масштаба (https://clinicaltrials.gov/, таблица 1).

4. Подходы к созданию спрея назального

При разработке спрея назального налтрексона гидрохлорида потребуется решить несколько задач [47].

4.1. Выбор концентрации действующего вещества.

Выбор концентрации налтрексона гидрохлорида может быть осуществлен на основании сравнения данных о его биодоступности при пероральном (ПО) и назальном введении [18]. Также следует учитывать его растворимость и другие физико-химические свойства.

Фармакокинетические характеристики налтрексона в зависимости от способа введения были исследованы на добровольцах (мужчины и женщины). Для этого сравнивали результаты, полученные при интраназальном введении 4 мг, внутримышечном (в/м) – 2 мг и перорально (ПО) – 50 мг налтрексона гидрохлорида.

Таблица 1. Некоторые клинические исследования НДН

Table 1. Selected clinical studies of LDN

№ исследования № study	Статус Status	Название исследования Study title	Заболевание Disease	Место проведения Locations
NCT01303835	Фаза 2 Phase 2	Низкие дозы налтрексона для лечения пациентов со злокачественной глиомой Low-dose naltrexone for the treatment of patients with malignant glioma	Злокачественная глиома Malignant glioma	Медицинский центр Университета Дьюка Дарем (Северная Каролина, США, 27710) Duke University Medical Center Durham (North Carolina, USA, 27710)
NCT01650350	Фаза 2 Phase 2	Низкая доза налтрексона для лечения метастатической меланомы, кастраторезистентного рака простаты и рака почек: исследовательский проект группы онкологии Low-dose naltrexone for the treatment of metastatic melanoma, castrate-resistant prostate cancer and kidney cancer: a research project of the oncology group	Рак почек, рак простаты, меланома Kidney cancer, prostate cancer, melanoma	Больница Мириам Провиденс (Род-Айленд, США, 02912) Miriam Providence Hospital (Rhode Island, USA, 02912)
NCT01874951	Фаза 2 Phase 2	Рандомизированное испытание, подтверждающее концепцию усиления антидепрессантов низкой дозой налтрексона (LDN) для пациентов с прорывными симптомами большого депрессивного расстройства, получающих антидепрессивную терапию A randomized trial confirming the concept of antidepressant augmentation with low dose naltrexone (LDN) for patients with breakthrough symptoms of major depressive disorder receiving antidepressant therapy	Депрессивное расстройство Depressive disorder	Массачусетская больница общего профиля; Программа исследований и клинических исследований депрессии (Бостон, Массачусетс, США, 02114) Massachusetts General Hospital; Depression Research and Clinical Research Program (Boston, MA, USA, 02114)
NCT00663117	Фаза 2 Phase 2	Влияние налтрексона на активную болезнь Крона (НДН) Effects of naltrexone on active Crohn's disease (NDI)	Болезнь Крона Crohn's disease	Медицинский центр Херши Государственного университета Пенсильвании (Херши, Пенсильвания, США, 17033) Pennsylvania State University Hershey Medical Center (Hershey, Pennsylvania, USA, 17033)
NCT03278886	Фаза 1 Phase 1	Пилотное исследование антагонистов опиоидных рецепторов для уменьшения боли и воспаления у ВИЧ-инфицированных лиц с проблемами алкоголя A pilot study of opioid receptor antagonists to reduce pain and inflammation in HIV-infected individuals with alcohol problems	ВИЧ-инфекция HIV infection	Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. Павлова (Санкт-Петербург, Россия, 197022) First Saint Petersburg State Medical University Pavlova (St. Petersburg, Russia, 197022)

При интраназальном введении 4 мг налтрексона гидрохлорида средняя концентрация в плазме крови через 2,5 и 5 минут после введения составляла 0,117 нг/мл и 1,51 нг/мл соответственно (рисунок 4). Средняя концентрация в плазме крови через 2,5 и 5 минут после внутримышечного ведения 2 мг налтрексона гидрохлорида составляла 0,678 и 1,04 нг/мл соответственно.

Пероральная абсорбция налтрексона была медленнее, чем после интраназального или внутримышечного введения. В течение первых 15 минут концентрация налтрексона гидрохлорида в плазме крови не превышала нижнего предела количественного определения, и только через 30 минут среднее значение C_{max} достигало 9,34 нг/мл.

Средний период полувыведения ($T_{1/2}$) налтрексона гидрохлорида в среднем составлял приблизительно 2–2,5 часа после интраназального и внутримышечного введения и 6 часов при пероральном введении.

При коррекции дозы максимальная концентрация в плазме крови C_{max} после интраназального введения 4 мг составляла приблизительно 60 % от значения после внутримышечной дозы 2 мг (таблица 2). Максимальная концентрация в плазме крови C_{max} после перорального приёма составляла около 9 % от значения C_{max} при внутримышечном введении. Среднее значение C_{max} после введения 2 мг внутримышечной дозы налтрексона было ниже, чем при интраназальном введении 4 мг. При этом T_{max} был достигнут через 20 минут. Средняя концентрация в плазме крови, взятой у испытуемых через 2,5 и 5 минут после внутримышечного введения 2 мг налтрексона гидрохлорида, составила 0,678 и 1,04 нг/мл соответственно.

Относительная интраназальная биодоступность налтрексона составила 48 % по сравнению с внутримышечным введением, а биодоступность при пероральном приёме составила 9 %. По другим источникам, пероральная биодоступность колеблется от 5 % до 60 % [48].

Учитывая величину пероральной дозировки налтрексона гидрохлорида, равную 1,5–5,0 мг/сут, и его биодоступность, составляющую 5–60 %, можно предположить, что при интраназальном введении должно обеспечиваться поступление в организм налтрексона гидрохлорида в диапазоне 0,075–3 мг/сут. Таким образом, при использовании насосов-дозаторов, обеспечивающих объем дозы 100 мкл, его концентрация в препарате, предположительно, должна быть около 3 %.

4.2. Выбор вспомогательных веществ

Для преодоления ферментативного барьера слизистой оболочки носа, физического барьера носового эпителия, мукоцилиарного клиренса и слоя слизи в состав спреев назальных наряду с активными соединениями входят различные вспомогательные вещества, которые обуславливают их физико-химичес-

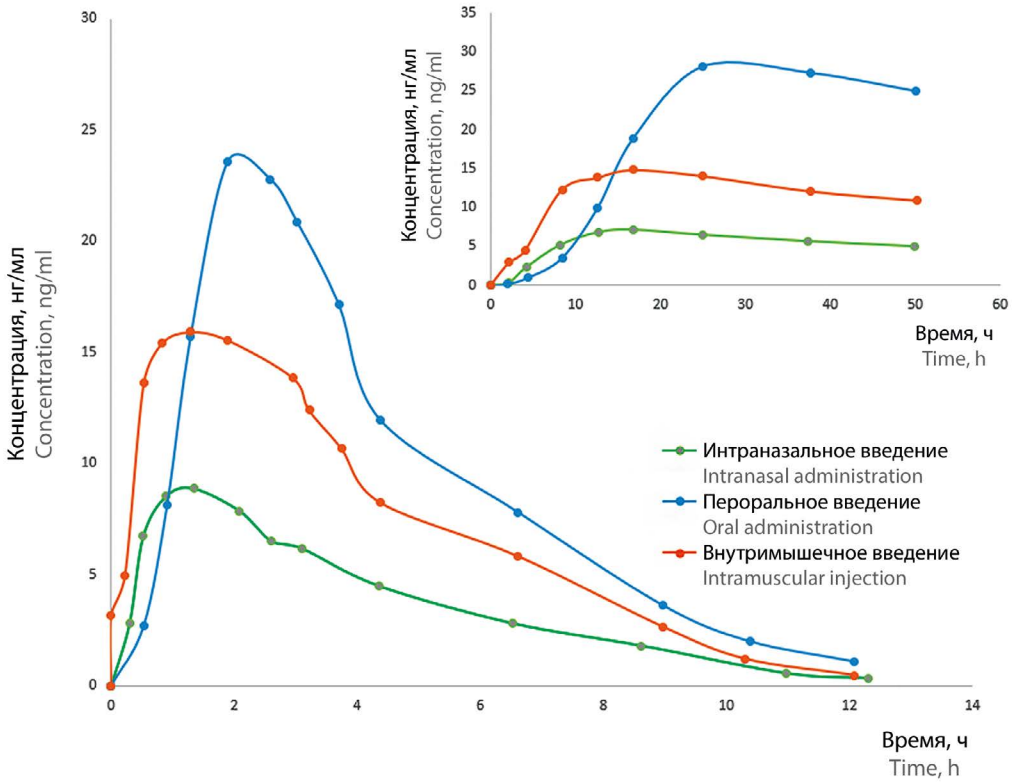


Рисунок 4. Концентрация налтрексона в плазме крови после интраназального, внутримышечного и перорального введений налтрексона HCl [18]

Figure 4. Plasma concentrations of naltrexone following intranasal, intramuscular, and oral administration of naltrexone HCl [18]

кие и потребительские свойства. Выбранные вспомогательные вещества должны быть разрешены к медицинскому применению и для обеспечения стабильности спрея должны быть совместимы с активным веществом и между собой.

По своему назначению вспомогательные вещества, используемые в составе назальных спреев, делятся на регуляторы вязкости, регуляторы pH и консерванты.

Таблица 2. Фармакокинетика налтрексона гидрохлорида после интраназального, внутримышечного и перорального введения [18]

Table 2. Pharmacokinetics of naltrexone hydrochloride after intranasal, intramuscular and oral administration [18]

Параметр Parameter	4 мг интраназал 4 mgintranasally	2 мг/м 2 mg/m	50 мг ПО 50 mg orally
Максимальная концентрация в плазме крови C_{max} (нг/мл) Maximum plasma concentration C_{max} (ng/ml)	5,4	4,1	9,3
Отношение максимальной концентрации к введенной дозе C_{max}/доза $\left(\frac{нг}{мл \cdot мг}\right)$ C_{max} per milligram administered C_{max}/dose, $\left(\frac{ng}{mL \cdot mg}\right)$	1,5	2,3	0,2
Время наступления максимальной концентрации, T_{max} (ч) T_{max}, time to C_{max} (h)	0,5	0,3	0,5
Площадь под кривой зависимости конц. в плазме крови от времени $AUC_{0-\infty}$ (нг · ч/мл) Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity, $AUC_{0-\infty}$ (ng · h/ml)	12,0	12,3	26,9
Отношение площади под кривой к введенной дозе $AUC_{0-\infty}$/доза $\left(\frac{нг \cdot мл}{ч \cdot мг}\right)$ $AUC_{0-\infty}$ per milligram administered, $AUC_{0-\infty}$/dose $\left(\frac{ng \cdot ml}{h \cdot mg}\right)$	3,3	6,8	0,6
Клиренс CL/F (л/ч) Apparent oral clearance (L/h)	330,0	154,0	1890
Период полувыведения $T_{1/2}$, (ч) Terminal half-life $T_{1/2}$, (h)	2,5	2,0	6,4

Регуляторы вязкости

Использование в качестве регуляторов вязкости мукоадгезивных полимеров, таких как полиакриловая кислота, карбомер, хитозан, альгинат натрия, метилцеллюлаза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, повышает комфортность их применения, позволяет увеличивать время контакта лекарственного препарата со слизистой оболочкой полости носа и приводит к увеличению абсорбции лекарственного вещества [49]. Некоторые из этих веществ относятся к так называемым умным («smart») полимерам. Их растворы способны загустевать или формировать гели при попадании в носовую полость («*in sity*») в результате повышения температуры [50], изменения pH или при взаимодействии с определенными катионами металлов [51].

Составы на основе термочувствительных или термообратимых полимеров имеют достаточно низкую вязкость при нормальных условиях, что позволяет эффективно их дозировать с помощью насадок-распылителей, и способны к увеличению вязкости при температуре, соответствующей назальной полости. Например, 10–20 % водные растворы полоксамеров загустевают при температуре 32–35 °C [52]. Их термообратимые свойства определяются концентрацией растворов и отношением молекулярных масс гидрофильного и гидрофобного участков полимера.

Помимо чистых растворов полимеров, также используют комбинации полимеров, например полоксамер и карбопол [53], полоксамер и полиакриловую кислоту [54], полоксамер и производные целлюлозы [55], что позволяет изменить время и температуру гелеобразования.

В качестве примера полимеров с pH-зависимым золь-гель-переходом можно привести карбомеры. Так, в кислой среде эти вещества находятся в состоянии раствора и имеют низкую вязкость. При увеличении значения pH до 5,0–7,0 происходит золь-гель-переход [50].

К ионрегулируемым полимерам относятся гелановая камедь (анионный полисахарид), альгинат натрия, комбинация сахарозы и пектина с низким содержанием метоксильных групп. Золь-гель-переход в растворах этих веществ осуществляется за счет взаимодействия с катионами калия, натрия, кальция, которые содержатся в физиологическом секрете назальной полости.

Из перечисленных веществ потенциальной совместимостью с налтрексона гидрохлоридом обладают полоксамеры или их композиции с производными целлюлозы.

При разработке состава необходимо провести исследования динамической вязкости препарата при различных скоростях сдвига и температурах, что позволит определить оптимальное содержание регуляторов вязкости, обеспечивающее возможность распыления препарата и его гелеобразование при температурах, близких к температуре носовой полости.

Регуляторы pH

При разработке назальных форм следует учитывать, что pH слизистой оболочки носа составляет 7,39 [56], а pH назального секрета составляет 5,5–6,5 [57]. Таким образом, для предотвращения раздражения слизистой оболочки носа спрей назальный должен иметь значение pH = 4,5–6,5.

Дополнительно следует учитывать, что налтрексона гидрохлорид и подобные ему соединения обладают большей устойчивостью в кислых средах, что

смещает желательный диапазон значений pH в область от 4,5 до 5,5.

Корректировку значения pH в составе спрея назального налтрексона гидрохлорида целесообразно проводить добавлением растворов лимонной кислоты или натрия гидроксида.

Консерванты

В процессе производства, хранения или применения назальных лекарственных препаратов существуют риски их микробной контаминации. Для предотвращения этого используют консерванты, разрешённые к медицинскому применению: натрия бензоат, бензалкония хлорид, сорбиновую и бензойную кислоты, этоний, метилпарагидроксибензоат и др. [58]. Исходя из необходимости обеспечения совместимости вспомогательных веществ с налтрексона гидрохлоридом и между собой, в составе спрея назального целесообразно использовать бензалкония хлорид или другие четвертичные аммониевые соединения. Следует отметить, что бензалкония хлорид способен оказывать раздражающее действие на слизистые оболочки носа, особенно при концентрации более 0,01 % [59]. В связи с этим при разработке препарата необходимо выбирать минимальную концентрацию консерванта, обеспечивающую консервирующее действие.

4.3. Изучение безопасности препарата

После выбора оптимального состава препарата необходимо провести исследования, подтверждающие безопасность применения разрабатываемого лекарственного препарата. В частности, исследовать его токсичность и местнораздражающее действие.

4.4. Выбор упаковки

Выбор упаковки является важным этапом в разработке назального лекарственного средства. Упаковка должна обеспечивать стабильность препарата в процессе установленного срока годности, а также при применении, транспортировке, хранении.

Для спрея назального необходимо выбрать насос-дозатор, который обеспечит оптимальные геометрические параметры распыла, распределение капель по размерам и точность доставляемой дозы.

Объём флаконов должен быть удобен для повседневного применения и вмещать достаточное количество препарата для использования в течение нескольких недель, т. к. имеющиеся данные свидетельствуют о необходимости достаточно длительного применения НДН.

Таким образом, в качестве упаковки спрея налтрексона гидрохлорида целесообразно использовать флаконы объемом 5 мл с насосами-дозаторами, обеспечивающими дозы 100 мкл, что позволит использовать одну упаковку препарата в течение месяца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные исследования в области применения низкодозированного налтрексона позволили установить механизмы его действия и определить возможные области его применения в медицинской практике. Печеночный метаболизм перорально вводимого налтрексона, сопровождающийся образованием значительных количеств метаболитов, способных вызывать побочные нервно-психические эффекты и желудочно-кишечные расстройства, требует поиска более безопасных в применении лекарственных форм. Отмечено, что интраназальное введение налтрексона гидрохлорида позволяет повысить его биодоступность и избежать первичного метаболизма. Подходы к разработке лекарственного препарата – спрея назального реализуются при подборе оптимального содержания активного вещества и вспомогательных компонентов препарата. Наиболее перспективно создание препарата на основе термообратимых полимеров с содержанием налтрексона гидрохлорида до 3,0 %

ЛИТЕРАТУРА

1. Elsegood L. The LDN Book: How a Little-Known Generic Drug – Low Dose Naltrexone – Could Revolutionize Treatment for Autoimmune Diseases, Cancer, Autism, Depression, and More. *Chelsea Green Publishing*; 2016. 217 p.
2. Sudakin D. Naltrexone: not just for opioids anymore. *Journal of Medical Toxicology*. 2016;12(1):71–75. DOI: 10.1007/s13181-015-0512-x.
3. Иванец Н. Н., Винникова М. А. Опыт применения вивитрола (налтрексон длительного действия в инъекциях) в зарубежной практике. *Казанский медицинский журнал*. 2009;90(5):744–752.
4. Jarvis B. P., Holtyn A.F., Subramaniam S., Tompkins D. A., Oga E. A., Bigelow G. E., Slverman K. Extended-release injectable naltrexone for opioid use disorder: a systematic review. *Addiction*. 2018;113(7): 1188–1209. DOI: 10.1111/add.14180.
5. Pullen L., Abbott A., Lamborn A., Harder S. A review of the use of oral and injectable naltrexone for alcohol and opioid addiction treatment. *Mental Health Practice*. 2020;23(3). DOI: 10.7748/mhp.2018.e1263.
6. Раменская Г. В., Е.В. Ших А. П. Арзамасцев В. Г. Кукес. Фармакокинетическое изучение новой отечественной пролонгированной формы налтрексона – депо-таблеток «Продетоксон». *Химико-фармацевтический журнал*. 2005;39(1):3–5. DOI: 10.30906/0023-1134-2005-39-1-3-5.
7. Schopick J., Bihari B. MD: low-dose naltrexone for normalizing immune system function. *Alternative therapies in health and medicine*. 2013;19(2):56.
8. Smith J. P. Stock H., Bingaman S., Mauger D., Rogosnitzky M., Zagon I. Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(4):820–828. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01045.x.
9. Berkson B. M., Rubin D. M., Berkson A. J. Reversal of signs and symptoms of a B-cell lymphoma in a patient using only low-dose naltrexone. *Integrative cancer therapies*. 2007;6(3):293–296.
10. Zylicz Z., Stork N., Krajnik M. Severe pruritus of cholestasis in disseminated cancer: developing a rational treatment strategy. A case report. *Journal of pain and symptom management*. 2005;29(1):100–103. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2004.04.009.
11. Younger J., Noor N., McCue R., Mackey S. Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: findings of a small, randomized, double-blind, placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(2):529–538. DOI: 10.1002/art.37734.

12. Liu N., Ma. M., Qu N., Wang R., Chen H., Hu F., Gao S., Shan F. Low-dose naltrexone inhibits the epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells in vitro and effects indirectly on tumor-associated macrophages *in vivo*. *International Immunopharmacology*. 2020;86:106718. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106718.
13. Wall M. E., Brine D. R., Perez-Reyes M. Metabolism and disposition of naltrexone in man after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism and Disposition*. 1981;9(4):369–375. DOI: 0090-9556/81/0904-0369$02.00/0.
14. Meyer M. C., Straughn A. B., Lo M. W., Schary W. L., Whitney C. C. Bioequivalence, dose-proportionality, and pharmacokinetics of naltrexone after oral administration. *The Journal of clinical psychiatry*. 1984;45(9):15–19.
15. Oncken C., Van Kirk J., Kranzler H. R. Adverse effects of oral naltrexone: analysis of data from two clinical trials. *Psychopharmacology*. 2001;154(4):397–402. DOI: 10.1007/s002130000666.
16. Comer S. D., Collins E. D., Kleber H. D., Nuwayser E. S., Kerrigan J. H., Fischman M. W. Depot naltrexone: long-lasting antagonism of the effects of heroin in humans. *Psychopharmacology*. 2002;159(4):351–360. DOI: 10.1007/s002130100909.
17. Nave R., Schmitt H., Popper L. Faster absorption and higher systemic bioavailability of intranasal fentanyl spray compared to oral transmucosal fentanyl citrate in healthy subjects. *Drug delivery*. 2013;20(5):216–223. DOI: 10.3109/10717544.2012.762435.
18. Krieter P., Gyaw S., Chiang C.N., Crystal R., Skolnick Ph. Enhanced intranasal absorption of naltrexone by dodecyl maltopyranoside: implications for the treatment of opioid overdose. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2019;59(7):947–957. DOI: 10.1002/jcph.1384.
19. Younger J., Parkitny L., McLain D. The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. *Clinical rheumatology*. 2014;33(4):451–459. DOI: 10.1007/s10067-014-2517-2.
20. Agarwal D., Toljan K., Qureshi H., Vrooman B. Therapeutic value of naltrexone as a glial modulator. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):529–38.
21. Wang X., Zhang Y., Peng Y., Hutchinson M. R., Rice K. C., Yin H., WatkinsL.R. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *British journal of pharmacology*. 2016;173(5):856–869. DOI: 10.1111/bph.13394.
22. Selfridge B. R., Wang X., Zhang Y., Yin H., Grace P. M., Watkins L. R., Ionescu D. F., Alpert J. E., Soskin D. P., Fava M. Structure – activity relationships of (+)-naltrexone-inspired toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(12):5038–5052. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00426.
23. Hutchinson M. R., M. R., Zhang Y., Brown K., Coats B. D., Shridhar M., Sholar P. W., Patel S. J.,Crysdale N. Y., Harrison J. A., Maier S. F, Rice K. C., Watkins L. R. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *European Journal of Neuroscience*. 2008;28(1):20–29. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06321.x.
24. Okun E., Griffioen K. J., Mattson M. P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences*. 2011;34(5):269–281. DOI: 10.1016/j.tins.2011.02.005.
25. Janković B. D., Radulović J. Enkephalins, brain and immunity: modulation of immune responses by methionine-enkephalin injected into the cerebral cavity. *International journal of neuroscience*. 1992;67(1-4):241–270. DOI: 10.3109/00207459208994788.
26. Rahn K. A., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Prevention and diminished expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by low dose naltrexone (LDN) or opioid growth factor (OGF) for an extended period: Therapeutic implications for multiple sclerosis. *Brain research*. 2011;1381:243–253. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.036.
27. Zagon I. S., Donahue R., McLaughlin P. J. Targeting the opioid growth factor: opioid growth factor receptor axis for treatment of human ovarian cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 2013;238(5):579–587. DOI: 10.1177/1535370213488483.
28. Rogosnitzky M., Finegold M. J., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Opioid growth factor (OGF) for hepatoblastoma: a novel non-toxic treatment. *Investigational new drugs*. 2013;31(4):1066–1070. DOI: 10.1007/s10637-012-9918-3.
29. Donahue R. N., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor–opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. *Experimental Biology and Medicine*. 2011;236(9):1036–1050. Doi:10.1258/ebm.2011.011121.
30. McLaughlin P. J., Zagon I. S. Duration of opioid receptor blockade determines biotherapeutic response. *Biochemical pharmacology*.2015;97(3):236–246. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.06.016.
31. Choubey A., Cirdhar K., Kar A. K., Kushwaha S., Yadav M. K., Ghosh D., Mondal P. Low dose naltrexone rescues inflammation and insulin resistance associated with hyperinsulinemia. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(48):16359–16369. DOI: jbc.RA120.013484.
32. McLaughlin P. J., Sassani J. W., Zagon I. S. Naltrexone as a Novel Therapeutic for Diabetic Corneal Complications. *Journal of Cellular Immunology*. 2020;2(2):42–46.
33. Kariv R., Tiomny E., Grenshpon R., Dekel R., Waisman G., Ringel Y., Halpern Z. Low-dose naltreoxone for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(12):2128–2133. DOI: 10.1007/s10620-006-9289-8.
34. Braude M. C., Harris L. C., May E. L., Smith J. P., Stock H., Bingaman S., Mauger D., Rogosnitzky M., Zagon I. S. Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(4):820–828. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01045.x
35. Donahue R. N. Pathways Targeted by the OGF-OGFr Axis are Determinants in the Progression of Human Ovarian Cancer. 2011. 333 p.
36. Smith J. P., Field D., Bingaman S., Evans R., Mauger D. Safety and tolerability of low dose naltrexone therapy in children with moderate to severe crohn's disease: a pilot study. *Journal of clinical gastroenterology*. 2013;47(4):339. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182702f2b.
37. Traore A. K., Thiero O., Dao S., Kounde F. F., Faye O., Cisse M., McCandless J. B., Zimmerman J. M., Coulibaly K., Diarra A., Keita M. S., Diallo S., Traore I. G., Koita O. Impact of low dose naltrexone (LDN) on antiretroviral therapy (ART) treated HIV+ adults in Mali: a single blind randomized clinical trial. *Journal of AIDS and HIV Research*. 2011;3(10):189–198. DOI: 10.5897/JAHR.9000030.
38. Ma M. Wang X., Liu N., Shan F., Feng Y. Low-dose naltrexone inhibits colorectal cancer progression and promotes apoptosis by increasing M1-type macrophages and activating the Bax/Bcl-2/caspase-3/PARP pathway. *International Immunopharmacology*. 2020; 83:106388.
39. Aboalsoud A., El-Ghaiesh S. H., Elmonem F. F. A., Salem M. L., Rahman M. A. A. The effect of low-dose naltrexone on solid Ehrlich carcinoma in mice: The role of OGFr, BCL2, and immune response. *International Immunopharmacology*. 2020;78:106068. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106388.
40. Patten D. K., Schultz B. G., Berlau D. J. The safety and efficacy of low-dose naltrexone in the management of chronic pain and inflammation in multiple sclerosis, fibromyalgia, Crohn's disease, and other chronic pain disorders. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;38(3):382–389. DOI: 10.1002/phar.2086.
41. Ludwig M. D., Zagon I. S., McLaughlin P. J. Featured Article: Serum [Met5]-enkephalin levels are reduced in multiple sclerosis and restored by low-dose naltrexone. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(15):1524–1533. DOI: 10.1177/1535370217724791.
42. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
43. Ekelem C., Juhasz M., Khera P., Mesinkovska N. A. Utility of naltrexone treatment for chronic inflammatory dermatologic conditions: a systematic review. *JAMA dermatology*. 2019;155(2):229–236. DOI: 10.1001/jamadermatol.2018.4093.
44. Kim P. S., Fishman M. A. Low-Dose Naltrexone for Chronic Pain: Update and Systemic Review. *Current Pain and Headache Reports*. 2020;24(10):1–8. DOI: 10.1007/s11916-020-00898-0.
45. Gomes M. S., Pereira J. A., Trocado V., Prata J. P., Teixera V, Pinheiro P. Vulvar Hailey–Hailey disease treated with low-dose naltrexone: case report and literature review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2020. P. 1–6. DOI: 10.1007/s00404-020-05705-0.

46. Parker C. E., Nguyen T. M., Segal D., MacDonald J. K., Chande N. Low dose naltrexone for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;4. DOI: 10.1002/14651858.CD010410.pub3.
47. Карпенко И. А., Рухмакова О. А., Ярных Т. Г. Методология фармацевтической разработки мягких лекарственных средств для назального применения. *Инновационная наука, образование, производство и транспорт: экономика, менеджмент, география и геология, сельское хозяйство, архитектура и строительство, медицина и фармацевтика*. 2018. 134–145 p.
48. Gonzalez J. P., Brogden R. N. Naltrexone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs* 1988;35:192–213. DOI: 10.2165/00003495-198835030-00002.
49. Jiang L. Gao L., Wang X., Tang L., Ma J. The application of mucoadhesive polymers in nasal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010;36(3):323–336. DOI: 10.3109/03639040903170750.
50. Chonkar A., Nayak U., Udupa N. Smart polymers in nasal drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;77(4):367.
51. Agrawal M., Saraf Sh., Saraf S., Dubey S. K., Puri A., Gupta U., Kesharwani P., Ravichandiran V., Kumar P., Nuidu V. G. M., Murty U. S., Ajazuddin A. A. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.
52. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):627–634. DOI: 10.1007/s11094-015-1342-5.
53. Mura P., Mennini N., Nativi C., Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;122:54–61. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.10.008.
54. Bhalerao A. V., Lonkar S. L., Deshkar S. S., Shirolkar S. V., Deshpande A. D. Nasal mucoadhesive in situ gel of ondansetron hydrochlorid. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;71(6):711.
55. Pund S., Rasve G., Borade G. Ex vivo permeation characteristics of venlafaxine through sheep nasal mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;48(1-2):195–201. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.10.029.
56. Shinichiro H., Takatsuka Y., Tai M., Hiroyuki M. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *International journal of pharmaceutics*. 1981;7(4):317–325. DOI: 10.1016/0378-5173(81)90058-2.
57. Крюков А. И., Артемьева-Карелова А. В. Реологические свойства назального секрета. Методы направленного воздействия. *Российская оториноларингология*. 2013;6:87–91.
58. ГФРФXIVОФС.1.4.1.0002.15 «Аэрозолииспреи».
59. Kuboyama Y., Suzuki K., Hara T. Nasal lesions induced by intranasal administration of benzalkonium chloride in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 1997;22(2):153–160. DOI: 10.2131/jts.22.2_153.

REFERENCES

1. Elsegood L. The LDN Book: How a Little-Known Generic Drug – Low Dose Naltrexone – Could Revolutionize Treatment for Autoimmune Diseases, Cancer, Autism, Depression, and More. *Chelsea Green Publishing*; 2016. 217 p.
2. Sudakin D. Naltrexone: not just for opioids anymore. *Journal of Medical Toxicology*. 2016;12(1):71–75. DOI: 10.1007/s13181-015-0512-x.
3. Ivanets N. N., Vinnikova M. A. Experience of using Vivitrol (long-acting naltrexone in injections) in foreign practice. *Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan medical journal*. 2009;90(5):744–752. (In Russ.).
4. Jarvis B. P., Holtyn A.F., Subramaniam S., Tompkins D. A., Oga E. A., Bigelow G. E., Slverman K. Extended-release injectable naltrexone for opioid use disorder: a systematic review. *Addiction*. 2018;113(7):1188–1209. DOI: 10.1111/add.14180.
5. Pullen L., Abbott A., Lamborn A., Harder S. A review of the use of oral and injectable naltrexone for alcohol and opioid addiction treatment. *Mental Health Practice*. 2020;23(3). DOI: 10.7748/mhp.2018.e1263.
6. Ramenskaya G. V., Shikh E. V., Arzamastsev A. P., Kukes V. G. Pharmacokinetic study of the new domestic prolonged form naltrexone – depo-tablets "Prodetoxon". *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2005;39(1):3–5. (In Russ). DOI: 10.30906/0023-1134-2005-39-1-3-5.
7. Schopick J., Bihari B. MD: low-dose naltrexone for normalizing immune system function. *Alternative therapies in health and medicine*. 2013;19(2):56.
8. Smith J. P. Stock H., Bingaman S., Mauger D., Rogosnitzky M., Zagon I. Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(4):820–828. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01045.x.
9. Berkson B. M., Rubin D. M., Berkson A. J. Reversal of signs and symptoms of a B-cell lymphoma in a patient using only low-dose naltrexone. *Integrative cancer therapies*. 2007;6(3):293–296.
10. Zylicz Z., Stork N., Krajnik M. Severe pruritus of cholestasis in disseminated cancer: developing a rational treatment strategy. A case report. *Journal of pain and symptom management*. 2005;29(1):100–103. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2004.04.009.
11. Younger J., Noor N., McCue R., Mackey S. Low-dose naltrexone for the treatment of fibromyalgia: findings of a small, randomized, double-blind, placebo-controlled, counterbalanced, crossover trial assessing daily pain levels. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(2):529–538. DOI: 10.1002/art.37734.
12. Liu N., Ma. M., Qu N., Wang R., Chen H., Hu F., Gao S., Shan F. Low-dose naltrexone inhibits the epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells in vitro and effects indirectly on tumor-associated macrophages *in vivo*. *International Immunopharmacology*. 2020;86:106718. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106718.
13. Wall M. E., Brine D. R., Perez-Reyes M. Metabolism and disposition of naltrexone in man after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism and Disposition*. 1981;9(4):369–375. DOI: 0090-9556/81/0904-0369$02.00/0.
14. Meyer M. C., Straughn A. B., Lo M. W., Schary W. L., Whitney C. C. Bioequivalence, dose-proportionality, and pharmacokinetics of naltrexone after oral administration. *The Journal of clinical psychiatry*. 1984;45(9):15–19.
15. Oncken C., Van Kirk J., Kranzler H. R. Adverse effects of oral naltrexone: analysis of data from two clinical trials. *Psychopharmacology*. 2001;154(4):397–402. DOI: 10.1007/s002130000666.
16. Comer S. D., Collins E. D., Kleber H. D., Nuwayser E. S., Kerrigan J. H., Fischman M. W. Depot naltrexone: long-lasting antagonism of the effects of heroin in humans. *Psychopharmacology*. 2002;159(4):351–360. DOI: 10.1007/s002130100909.
17. Nave R., Schmitt H., Popper L. Faster absorption and higher systemic bioavailability of intranasal fentanyl spray compared to oral transmucosal fentanyl citrate in healthy subjects. *Drug delivery*. 2013;20(5):216–223. DOI: 10.3109/10717544.2012.762435.
18. Krieter P., Gyaw S., Chiang C.N., Crystal R., Skolnick Ph. Enhanced intranasal absorption of naltrexone by dodecyl maltopyranoside: implications for the treatment of opioid overdose. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2019;59(7):947–957. DOI: 10.1002/jcph.1384.
19. Younger J., Parkitny L., McLain D. The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. *Clinical rheumatology*. 2014;33(4):451–459. DOI: 10.1007/s10067-014-2517-2.
20. Agarwal D., Toljan K., Qureshi H., Vrooman B. Therapeutic value of naltrexone as a glial modulator. *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):529–38.
21. Wang X., Zhang Y., Peng Y., Hutchinson M. R., Rice K. C., Yin H., Watkins L. R. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *British journal of pharmacology*. 2016;173(5):856–869. DOI: 10.1111/bph.13394.
22. Selfridge B. R., Wang X., Zhang Y., Yin H., Grace P. M., Watkins L. R., Ionescu D. F., Alpert J. E., Soskin D. P., Fava M. Structure–activity relationships of (+)-naltrexone-inspired toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists. *Journal of medicinal chemistry*. 2015;58(12):5038–5052. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00426.
23. Hutchinson M. R., M. R., Zhang Y., Brown K., Coats B. D., Shridhar M., Sholar P. W., Patel S. J.,Crysdale N. Y., Harrison J. A., Maier S. F, Rice K. C., Watkins L. R. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *European Journal of Neuroscience*. 2008;28(1):20–29. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06321.x.

24. Okun E., Griffioen K. J., Mattson M. P. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences*. 2011;34(5):269–281. DOI: 10.1016/j.tins.2011.02.005.
25. Janković B. D., Radulović J. Enkephalins, brain and immunity: modulation of immune responses by methionine-enkephalin injected into the cerebral cavity. *International journal of neuroscience*. 1992;67(1-4):241–270. DOI: 10.3109/00207459208994788.
26. Rahn K. A., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Prevention and diminished expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by low dose naltrexone (LDN) or opioid growth factor (OGF) for an extended period: Therapeutic implications for multiple sclerosis. *Brain research*. 2011;1381:243–253. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.036.
27. Zagon I. S., Donahue R., McLaughlin P. J. Targeting the opioid growth factor: opioid growth factor receptor axis for treatment of human ovarian cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 2013;238(5):579–587. DOI: 10.1177/1535370213488483.
28. Rogosnitzky M., Finegold M. J., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Opioid growth factor (OGF) for hepatoblastoma: a novel non-toxic treatment. *Investigational new drugs*. 2013;31(4):1066–1070. DOI: 10.1007/s10637-012-9918-3.
29. Donahue R. N., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor–opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. *Experimental Biology and Medicine*. 2011;236(9):1036–1050. Doi:10.1258/ebm.2011.011121.
30. McLaughlin P. J., Zagon I. S. Duration of opioid receptor blockade determines biotherapeutic response. *Biochemical pharmacology.*2015;97(3):236–246. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.06.016.
31. Choubey A., Cirdhar K., Kar A. K., Kushwaha S., Yadav M. K., Ghosh D., Mondal P. Low dose naltrexone rescues inflammation and insulin resistance associated with hyperinsulinemia. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(48):16359–16369. DOI: jbc.RA120.013484.
32. McLaughlin P. J., Sassani J. W., Zagon I. S. Naltrexone as a Novel Therapeutic for Diabetic Corneal Complications. *Journal of Cellular Immunology*. 2020;2(2):42–46.
33. Kariv R., Tiomny E., Grenshpon R., Dekel R., Waisman G., Ringel Y., Halpern Z. Low-dose naltreoxone for the treatment of irritable bowel syndrome: a pilot study. *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(12):2128–2133. DOI: 10.1007/s10620-006-9289-8.
34. Braude M. C., Harris L. C., May E. L., Smith J. P., Stock H., Bingaman S., Mauger D., Rogosnitzky M., Zagon I. S. Low-dose naltrexone therapy improves active Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2007;102(4):820–828. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01045.x
35. Donahue R. N. Pathways Targeted by the OGF-OGFr Axis are Determinants in the Progression of Human Ovarian Cancer. 2011. 333 p.
36. Smith J. P., Field D., Bingaman S., Evans R., Mauger D. Safety and tolerability of low dose naltrexone therapy in children with moderate to severe crohn's disease: a pilot study. *Journal of clinical gastroenterology*. 2013;47(4):339. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182702f2b.
37. Traore A. K., Thiero O., Dao S., Kounde F. F., Faye O., Cisse M., McCandless J. B., Zimmerman J. M., Coulibaly K., Diarra A., Keita M. S., Diallo S., Traore I. G., Koita O. Impact of low dose naltrexone (LDN) on antiretroviral therapy (ART) treated HIV+ adults in Mali: a single blind randomized clinical trial. *Journal of AIDS and HIV Research*. 2011;3(10):189–198. DOI: 10.5897/JAHR.9000030.
38. Ma M. Wang X., Liu N., Shan F., Feng Y. Low-dose naltrexone inhibits colorectal cancer progression and promotes apoptosis by increasing M1-type macrophages and activating the Bax/Bcl-2/caspase-3/PARP pathway. *International Immunopharmacology*. 2020; 83:106388.
39. Aboalsoud A., El-Ghaiesh S. H., Elmonem F. F. A., Salem M. L., Rahman M. A. A. The effect of low-dose naltrexone on solid Ehrlich carcinoma in mice: The role of OGFr, BCL2, and immune response. *International Immunopharmacology*. 2020;78:106068. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106388.
40. Patten D. K., Schultz B. G., Berlau D. J. The safety and efficacy of low-dose naltrexone in the management of chronic pain and inflammation in multiple sclerosis, fibromyalgia, Crohn's disease, and other chronic pain disorders. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;38(3):382–389. DOI: 10.1002/phar.2086.
41. Ludwig M. D., Zagon I. S., McLaughlin P. J. Featured Article: Serum [Met5]-enkephalin levels are reduced in multiple sclerosis and restored by low-dose naltrexone. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(15):1524–1533. DOI: 10.1177/1535370217724791.
42. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
43. Ekelem C., Juhasz M., Khera P., Mesinkovska N. A. Utility of naltrexone treatment for chronic inflammatory dermatologic conditions: a systematic review. *JAMA dermatology*. 2019;155(2):229–236. DOI: 10.1001/jamadermatol.2018.4093.
44. Kim P. S., Fishman M. A. Low-Dose Naltrexone for Chronic Pain: Update and Systemic Review. *Current Pain and Headache Reports*. 2020;24(10):1–8. DOI: 10.1007/s11916-020-00898-0.
45. Gomes M. S., Pereira J. A., Trocado V., Prata J. P., Teixera V, Pinheiro P. Vulvar Hailey–Hailey disease treated with low-dose naltrexone: case report and literature review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2020. P. 1–6. DOI: 10.1007/s00404-020-05705-0.
46. Parker C. E., Nguyen T. M., Segal D., MacDonald J. K., Chande N. Low dose naltrexone for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;4. DOI: 10.1002/14651858.CD010410.pub3.
47. Karpenko I. A., Rukhmakova O. A., Yarnykh T. G. Methodology for pharmaceutical development of soft drugs for nasal application. *Innovatsionnaya nauka, obrazovanie, proizvodstvo i transport: ekonomika, menedzhment, geografiya i geologiya, sel'skoe khozyaystvo, arkhitektura i stroitel'stvo, meditsina i farmatsevtika*. 2018. 134–145 p. (In Russ.).
48. Gonzalez J. P., Brogden R. N. Naltrexone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs* 1988;35:192–213. DOI: 10.2165/00003495-198835030-00002.
49. Jiang L. Gao L., Wang X., Tang L., Ma J. The application of mucoadhesive polymers in nasal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*. 2010;36(3):323–336. DOI: 10.3109/03639040903170750.
50. Chonkar A., Nayak U., Udupa N. Smart polymers in nasal drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;77(4):367.
51. Agrawal M., Saraf Sh., Saraf S., Dubey S. K., Puri A., Gupta U., Kesharwani P., Ravichandiran V., Kumar P., Nuidu V. G. M., Murty U. S., Ajazuddin A. A. Stimuli-responsive In situ gelling system for nose-to-brain drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.044.
52. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Demina N. B. Review of contemporary gel-forming agents in the technology of dosage forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(9):627–634. DOI: 10.1007/s11094-015-1342-5.
53. Mura P., Mennini N., Nativi C., Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;122:54–61. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.10.008.
54. Bhalerao A. V., Lonkar S. L., Deshkar S. S., Shirolkar S. V., Deshpande A. D. Nasal mucoadhesive in situ gel of ondansetron hydrochlorid. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;71(6):711.
55. Pund S., Rasve G., Borade G. Ex vivo permeation characteristics of venlafaxine through sheep nasal mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;48(1-2):195–201. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.10.029.
56. Shinichiro H., Takatsuka Y., Tai M., Hiroyuki M. Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat. *International journal of pharmaceutics*. 1981;7(4):317–325. DOI: 10.1016/0378-5173(81)90058-2.
57. Krukov A. I., Artemyeva-Karelova A. V. The rheological properties of nasal secretions. Methods of targeting. *Rossijskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*. 2013;6:87–91. (In Russ).
58. GF RF XIV OFS.1.4.1.0002.15«Aerozoli isprei». (In Russ).
59. Kuboyama Y., Suzuki K., Hara T. Nasal lesions induced by intranasal administration of benzalkonium chloride in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 1997;22(2):153–160. DOI: 10.2131/jts.22.2_153.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолина) как носители для трансбуккальной доставки метформина

А. С. Викторова[1], Е. С. Елизарова[1], Р. С. Романова[1], В. Р. Тимергалиева[1], В. В. Хуторянский[1,2], Р. И. Мустафин[1]*

1 – Институт фармации, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16
2 – Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

***Контактное лицо:** Мустафин Руслан Ибрагимович. **E-mail:** rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: А. С. Викторова – https://orcid.org/0000-0001-9849-1968; Е. С. Елизарова – https://orcid.org/0000-0001-9264-9576; Р. С. Романова – https://orcid.org/0000-0001-9454-2895; В. Р. Тимергалиева – https://orcid.org/0000-0002-3690-8905; В. В. Хуторянский – https://orcid.org/0000-0002-7221-2630; Р. И. Мустафин – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Статья поступила: 20.11.2020. **Статья принята в печать:** 21.12.2020. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Трансбуккальная доставка лекарственных веществ (ЛВ) имеет ряд преимуществ по сравнению с пероральным введением: удобство применения для пациента, хорошее кровоснабжение буккальной слизистой, ЛВ попадают непосредственно в системный кровоток, минуя «эффект первого прохождения через печень», а также не подвергаются воздействию кислой среды желудочного сока и разрушающего действия пищеварительных ферментов. Применение интерполимерных комплексов (ИПК) позволяет не только обеспечить адгезию к слизистым оболочкам ротовой полости, но и получить пролонгированное высвобождение ЛВ.

Цель. Разработка носителей на основе интерполимерных комплексов с участием Carbopol® 971 NF и поли(2-этил-2-оксазолина) разных молекулярных масс для трансбуккальной доставки метформина (МФ).

Материалы и методы. Исследование адгезии ИПК проводилось на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания), в качестве субстрата использовали компакты муцина диаметром 13 мм, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при давлении 2,45 МПа. Исследование набухающей способности проводили помещением полимерных матриц в среду искуственной слюны при постоянном термостатировании при температуре 37,0 ± 0,5 °С в течение 5 часов. Исследование высвобождения метформина из матриц на основе соответствующих ИПК производилось на приборе DFZ II (ERWEKA, Германия) по методу USP IV «Проточная ячейка» с использованием ячеек для таблеток (22,6 мм) и адаптеров для изучения высвобождения мягких лекарственных форм – ЛФ (мазей, кремов, гелей) в среде, имитирующей слюнную жидкость. Оценка количества высвободившегося МФ проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 232,8 нм.

Результаты и обсуждение. При сравнительном исследовании мукоадгезивных свойств образцов полимеров компакты из ИПК показали сопоставимую с поли(2-этил-2-оксазолином (ПО) разных молекулярных масс (50 и 500 кДа) способность к мукоадгезии; в то же время компакты из физических смесей (ФС) полимеров и Carbopol® 971 NF (С971) уступают по показателю силы отрыва образцам ИПК, при этом ПО растворяются в среде искусственный слюны, то есть непригодны для трансбуккальных систем. За 5 часов эксперимента, по оценке набухающей способности, матрицы ИПК изменились незначительно, что может обеспечить их комфортное для пациента использование в качестве носителей для буккальной доставки. При оценке высвобождения ЛВ из матриц (при соотношении МФ/ИПК 1:0,5) наиболее полное высвобождение (более 90 %) происходит из обеих матриц ИПК по сравнению с матрицами ФС и индивидуальных полимеров.

Заключение. Поликомплексные матричные системы на основе С971-ПО 50 кДа, С971-ПО 500 кДа являются подходящими для трансбуккальной доставки метформина.

Ключевые слова: интерполимерные комплексы, метформин, трансбуккальная доставка, Carbopol® 971 NF, полиоксазолины, адгезия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. С. Викторова, Е. С. Елизарова и Р. С. Романова проводили приготовление образцов, оценку набухающих, биоадгезивных свойств, высвобождения. В. Р. Тимергалиева написала и проводила корректировку статьи. В. В. Хуторянский и Р. И. Мустафин осуществляли концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корректировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (научный проект № 20-75-00051). Авторы выражают благодарность компании ERWEKA GmbH за предоставленную возможность выполнения работы на приборе «Проточная ячейка» DFZ II, а также компании Lubrizol Advance Materials за предоставление образца полимера Carbopol® 971 NF.

Для цитирования: Викторова А. С., Елизарова Е. С., Романова Р. С., Тимергалиева В. Р., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И. Интерполимерные комплексы на основе Carbopol® и поли(2-этил-2-оксазолина) как носители для трансбуккальной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):48–55. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55

Interpolymer Complexes Based on Carbopol® and Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Carriers for Buccal Delivery of Metformin

Anastasia S. Viktorova[1], Elizaveta S. Elizarova[1], Regina S. Romanova[1], Venera R. Timergalieva[1], Vitaliy V. Khutoryanskiy[1,2], Rouslan I. Moustafine[1]*

1 – Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia
2 – Reading School of Pharmacy, University of Reading, Whiteknights, PO box 224, Reading RG66AD, United Kingdom

***Corresponding author:** Rouslan I. Moustafine. **E-mail:** rouslan.moustafine@gmail.com

ORCID: Anastasia S. Viktorova – https://orcid.org/0000-0001-9849-1968; Elizaveta S. Elizarova – https://orcid.org/0000-0001-9264-9576; Regina S. Romanova – https://orcid.org/0000-0001-9454-2895; Venera R. Timergalieva – https://orcid.org/0000-0002-3690-8905; Vitaliy V. Khutoryanskiy – https://orcid.org/0000-0002-7221-2630; Rouslan I. Moustafine – https://orcid.org/0000-0002-0916-2853.

Received: 20.11.2020. **Revised:** 21.12.2020. **Published:** 25.02.2021

© Викторова А. С., Елизарова Е. С., Романова Р. С., Тимергалиева В. Р., Хуторянский В. В., Мустафин Р. И., 2021
© Viktorova A. S., Elizarova E. S., Romanova R. S., Timergalieva V. R., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I., 2021

Abstract

Introduction. Buccal drug delivery has a number of advantages over oral administration: ease of application, good blood supply to the buccal mucosa, drug can enter the systemic circulation directly, avoiding the "first pass effect through the liver", and are not exposed to the acidic environment of the gastric juice and the destructive action of digestive enzymes. The use of interpolymer complexes (IPCs) makes it possible not only to ensure adhesion to the mucosal membranes of the oral cavity, but also to achieve a prolonged release of drugs.

Aim. Development of carriers based on interpolymer complexes using Carbopol® 971 NF (C971) and poly(2-ethyl-2-oxazoline) (POZ) of different molecular weights for buccal delivery of metformin (MF).

Materials and methods. The study of IPC adhesion was carried out using a TA.XTplus texture analyzer (Stable Micro Systems, UK); mucin compacts with a diameter of 13 mm were used as a substrate; these were prepared by compressing porcine gastric mucin powder using a manual hydraulic press for IR spectroscopy (PerkinElmer, USA) at a pressure of 2.45 MPa. The study of the swelling capacity was carried out by placing polymer matrices in an artificial saliva medium, with constant thermostating at a temperature of 37.0 ± 0.5 °C for 5 hours. The study of the release of MF from the matrices based on IPC was carried out using a DFZ II apparatus (Erweka, Germany) according to the Flow Through Cell method (USP IV) with cells for tablets (22.6 mm) and adaptors for ointments, creams and gels in a medium simulating saliva. The concentration of MF in the samples from the dissolution tests was determined with UV-spectrophotometry (Lambda, PerkinElmer, USA) at 232.8 nm.

Results and discussion. In a comparative study of the mucoadhesive properties of polymer samples, IPC compacts showed a mucoadhesion capacity comparable to that of poly(2-ethyl-2-oxazoline); at the same time, compacts from physical mixtures (PM) and C971 are inferior in terms of the separation force to IPC samples, however, POZes dissolve in an artificial saliva medium, that is, they are not suitable as dosage forms for buccal delivery. For 5 hours of the experiment to assess the swelling capacity, the IPC matrices did not change significantly, which can ensure their comfortable use as carriers for buccal delivery. When evaluating the release of metformin from polymer matrices (with weight ratio MF/IPC 1: 0.5), the most complete release (more than 90 %) is observed from both IPC matrices compared to matrices of PM and individual polymers.

Conclusion. Polycomplex matrix systems based on C971-POZ (50 kDa) and C971-POZ (500 kDa) are suitable for buccal delivery of metformin.

Keywords: interpolymer complexes, metformin, buccal delivery, polyoxazoline, adhesion.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anastasia S. Viktorova, Elizaveta S. Elizarova and Regina S. Romanova have carried out the preparation of samples, evaluation of swelling and bioadhesive properties as well as experiments on drug release. Venera R. Timergalieva prepared and corrected the article. Vitaliy V. Khutoryanskiy and Rouslan I. Moustafine were responsible for conceptualization and research methodology, as well as reviewed and corrected the article. The article was written with the participation of all coauthors. All of the above authors agreed on the final version of the article.

Acknowledgment. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (RSF) in the framework of research project № 20-75-00051 (to V.R.T.). The authors are also grateful to ERWEKA GmbH for the opportunity to work on the Flow Through Cell Apparatus DFZ II, and also to Lubrizol Advance Materials for providing Carbopol® 971 NF.

For citation: Viktorova A. S., Elizarova E. S., Romanova R. S., Timergalieva V. R., Khutoryanskiy V. V., Moustafine R. I. Interpolymer complexes based on Carbopol® and poly(2-ethyl-2-oxazoline) as carriers for buccal delivery of metformin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):48–55. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-48-55

ВВЕДЕНИЕ

Доставка через слизистые оболочки имеет ряд преимуществ по сравнению с пероральным способом введения ЛВ. К преимуществам трансбуккальной доставки можно отнести: удобство применения для пациента, прикрепление ЛФ не только безболезненно, но и не вызывает дискомфорта, а в случае нежелательной реакции систему легко извлечь. Кроме того, буккальная слизистая характеризуется хорошим кровоснабжением и ЛВ попадают непосредственно в системный кровоток, минуя «эффект первого прохождения через печень», а также не подвергаются воздействию кислой среды желудочного сока и разрушающего действия пищеварительных ферментов [1, 2].

На протяжении многих десятилетий исследуются мукоадгезивные свойства полимеров синтетического и природного происхождения. Одним из вариантов усиления адгезионных свойств лекарственных форм явилось комбинирование химически комплементарных типов макромолекул с образованием интерполимерных комплексов (ИПК), успешно зарекомендовавших себя в качестве носителей и в биоадгезивных системах доставки лекарств [3, 4]. Одной из первых, кому удалось доказать перспективность данного направления, явилась группа японских исследователей под руководством Nagai [5, 6], показавших перспективность ИПК, полученных сочетанием редкосшитой полиакриловой кислоты (карбоксивиниловый полимер, карбомер, Carbopol®) с гидроксипропилцеллюлозой [5] или поливинилпирролидоном [6] путем образования между ними межмакромолекулярных водородных связей [7, 8].

Ранее нашей научной группой были исследованы мукоадгезивные свойства интерполиэлектролитных комплексов (ИПЭК), образованных полианионами (Carbopol® (71g NF, 2020 NF, 10 Ultrez), Noveon® AA-1) и противоположно заряженными поликатионами (Eudragit® EPO, хитозаном – ХТ3) [9, 10]. Разработана система для гастроретентивной доставки метронидазола на основе сополимеров Eudragit® [11]. А также предложена система для трансбуккальной доставки метронидазола на основе ИПЭК Noveon AA-1 и Eudragit® EPO [12]. Ранее нами были также получены и охарактеризованы ИПК на основе С971/ПО, а

также изучены диффузионно-транспортные свойства на примере создания поликомплексной матричной системы доставки месалазина в область толстого кишечника [13].

Схематично протекание интерполимерной реакции между изучаемыми полимерами представлено на рисунке 1.

Целью этой работы явилось изучение применимости ИПК с участием Carbopol® 971 NF (протоно-донорный полимер) и поли(2-этил-2-оксазолина) (протоно-акцепторный полимер) разных молекулярных масс в качестве новых мукоадгезивных носителей для трансбуккальной доставки гипоглейкемического ЛВ – метформина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поли(2-этил-2-оксазолин) различных молекулярных масс (ПО 50 кДа и ПО 500 кДа) был приобретен у компании Sigma-Aldrich (Великобритания). Carbopol® 971 NF (редкосшитый, 4000–11000 сП, 3000 кДа) (С971) был любезно предоставлен компанией Lubrizol Advanced Materials, Inc. (США).

Полимеры использовались после высушивания под вакуумом при температуре 40 °С в течение 2 дней. В качестве модельного ЛВ использовали метформин (Sigma-Aldrich, Бельгия). Для исследования биоадгезионных свойств использовали муцин, выделенный из желудков свиней (тип II) (Sigma-Aldrich, США).

Получение ИПК на основе С971 и ПО 50 кДа и ПО 500 кДа при соотношении 1,25:1 (по молям) с преобладанием карбопола проводилось при pH 4,5 и 4,3 для поли(2-этил-2-оксазолина) с молекулярной массой 50 и 500 кДа соответственно, по методике, описанной ранее [13].

Мукоадгезия поликомплексных матриц исследовалась на анализаторе текстуры TA.XTplus (Stable Micro Systems, Великобритания); в качестве субстрата использовали компакты муцина, полученные путем прессования на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США), с использованием пресс-инструмента диаметром 13 мм (PIKE Technologies, США) при давлении 2,45 МПа в течении 10 секунд.

Для исследования мукоадгезии и определения степени набухания готовили плоскоцилиндрические таблетки из полимерного носителя 100 мг путем прессования заданного количества порошков (С971, ПО 50 кДа, ПО 500 кДа, их ФС и поликомплексов на основе С971-ПО 50 кДа, С971-ПО 500 кДа) на ручном гидравлическом прессе аналогично описанию, представленному выше. Исследование набухающей способности проводили помещением полимерных матриц в корзинки (из аппарата USP I), которые были погружены в термостат IC control eco 18c (IKA® Werke GmbH, Германия) при 37,0 ± 0,5 °С. Объем среды искусственной слюны со значением pH = 7,0, приготовленной по методике [14], составлял 40 мл. Корзинки извлекались из среды каждые 15 минут в течение первого часа, а затем каждые 30 минут; корзинки с таблетками были тщательно высушены с использованием фильтровальной бумаги и взвешены. Степень набухания (*H*%) рассчитывали по следующему уравнению:

$$H\% = (m_2 - m_1/m_1) \times 100,$$

где m_1 – вес сухого образца; m_2 – вес набухшего образца.

Исследование высвобождения МФ из матриц на основе соответствующих ИПК производилось на приборе DFZ II (ERWEKA, Германия) по методу USP 4 («Проточная ячейка») в закрытом цикле с использованием специальных адаптеров для исследования мягких ЛФ (мази, кремы, гели) в среде, имитирующей слюнную жидкость. Концентрацию МФ в отбираемых коллектором фракций пробах определяли в течение 5 часов при скорости ламинарного потока, создаваемого добавлением в ячейку стеклянных шариков размером 1 мм, 4 мл/мин, близкой к фактической скорости поступления слюнной жидкости во рту человека [1, 15]. Матрицы, содержащие смесь полимерного

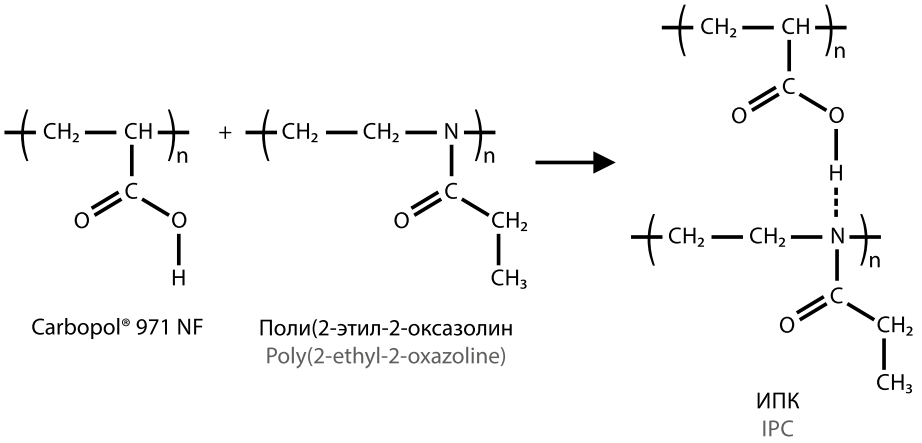


Рисунок 1. Схема образования интерполимерного комплекса на основе Carbopol® 971 NF и поли(2-этил-2-оксазолина)

Figure 1. Scheme of formation of interpolymer complexes based on Carbopol® 971 NF and poly(2-ethyl-2-oxazoline)

носителя и МФ в соотношении 0,5:1 (по массе), диаметром 13 мм таблетировали на ручном гидравлическом прессе для ИК-спектроскопии (PerkinElmer, США) при тех же условиях, что при определении мукоадгезии и изучения процесса набухания. Оценка количества высвободившегося ЛВ проводилась УФ-спектрофотометрически на приборе Lambda 25 (PerkinElmer, США) при длине волны 232,8 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что группа полимеров типа поли(2-этил-2-оксазолина) впервые была описана ещё в 1960 году, их интенсивные исследования пришлись на текущую декаду [16]. Как оказалось, ПО оказались нетоксичными, биосовместимыми и биоинертными неионогенными полимерами, что позволило им стать весьма перспективными материалами для биомедицинского применения и претендовать на роль альтернативы широко используемым для этого полиэтиленгликолям [17]. Несмотря на показанную перспективность ПО, исследований по возможностям их использования в фармацевтической технологии, и в частности в системах доставки лекарств, пока что очень немного [18–20].

Пожалуй, наиболее близкой к цели нашего исследования явилась недавняя публикация Ruiz-Rubio и др. [14], в которой авторы изучили взаимодействие двух типов карбопола (Carbopol® 971 и 974) с ПО и показали перспективность применения ИПК на их основе в качестве носителей для буккальной доставки гидрокортизона. В качестве модели для изучения мукоадгезии авторами использовались изолированные ткани щек свиней, а также стандартный метод растворения «Вращающейся лопасти» (USP II), применяемый в большинстве случаев при изучении высвобождения ЛВ из буккальных систем [21–26].

Системный анализ публикаций по выбору метода, максимально приближенного к фактическим условиям аппликации трансбуккальных ЛФ, показал, что для исследования высвобождения ЛВ применяются четыре основных варианта с использованием фармакопейных аппаратов: уже упомянутый выше метод «Вращающейся лопасти» (USP II) с помещением таблетки на поверхность среды растворения [27]; модифицированный метод USP II, отличающийся тем, что у буккальной системы одна поверхность ограничена непроницаемой мембраной, а другая приклеивается цианакрилатным клеем к стеклу размером 2×2 см, помещаемому в среду растворения; третий – модифицированный метод USP I [согласно фармакопеи Италии, Farmacopea Ufficiale XI Ed. (F.U.XI)], заключающийся в использовании стержня (держателя корзинки), на нижнюю платформу которого вместо корзинки крепится таблетка, поверхностью, предварительно смоченной 50 мкл искусственной слюной жидкости, и по прошествии 2 минут, после заполнения сосуда средой растворения, начинают процесс высвобождения [28]; и четвертый – метод «Проточная ячейка» (USP IV) в конфигурации «открытый цикл» с использованием больших ячеек для таблеток (22,6 мм) и минимальной скорости потока, подающего искусственную слюнную жидкость с минимально возможной скоростью 2–4 мл/мин [29]. Помимо этого, китайскими исследователями описана и запатентована система, разработанная специально для изучения процесса высвобождения из буккальных ЛФ, в основе которой лежит устройство, схема и принцип работы которого весьма схожи с вертикальной ячейкой Франца с той лишь разницей, что она является проточной, а ЛФ фиксируется на ее верхней крышке, открывая таким образом для высвобождения ЛВ лишь одну из поверхностей системы [30].

Анализируя описанные в литературе варианты, мы посчитали целесообразным объединение принципа, положенного в основу изобретения китайских ученых, и одного из адаптеров, представленных в широком ассортименте производителями аппаратов «Проточная ячейка» (ERWEKA, Германия; Sotax AG, Швейцария) и рекомендуемых Американской, Европейской, Британской и другими фармакопеями при исследовании соответствующих ЛФ. По этой причине нас заинтересовал адаптер для изучения высвобождения из мягких ЛФ (мазей, кремов, гелей), использование которого позволяет, с одной стороны обеспечить участие в процессе высвобождения преимущественно одной из поверхностей системы доставки, а с другой – постоянство ламинарного притока среды растворения с невысокой скоростью с нижней стороны ЛФ, что, по нашему мнению, приближает эти условия к естественным условиям притока слюнной жидкости во рту к буккальной таблетке. В этой связи нам в рамках данного исследования показалось интересным оценить предлагаемый вариант как дополнительный метод, позволяющий произвести оценку высвобождения ЛВ из трансбуккальной системы доставки.

Как известно, одним из важных свойств полимерного носителя для трансбуккальной доставки является способность к набуханию и выраженные мукоадгезивные свойства с целью получения пролонгированного высвобождения ЛВ при аппликации системы [1, 2].

Для оценки мукоадгезии исследуемых полимеров к слизистой оболочке нами был использован метод, основанный на измерении силы отрыва [31]. Для оценки мукоадгезии предварительно смачивали компакт муцина раствором, имитирующим слюнную жидкость, для образования поверхностного гелевого слоя. Затем плавно с силой в 0,1 Н на 60 секунд происходило сжатие матрицы исследуемого образца, после чего происходил отрыв матрицы от муцинового компакта на заданное расстояние и фиксировалась сила отрыва матрицы [9, 10].

На рисунке 2 представлены результаты измерения силы отрыва исследуемых образцов. При сравнительном исследовании мукоадгезивных свойств образцов полимеров компакты из ИПК показали сопоставимую

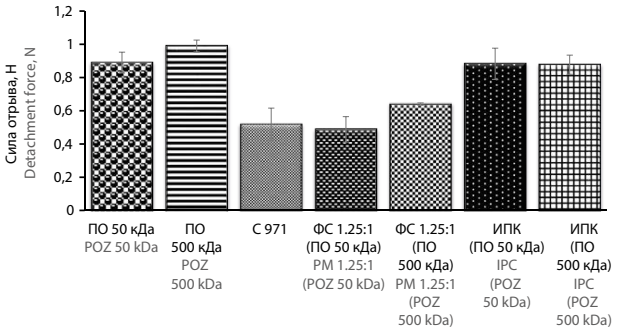


Рисунок 2. Результаты измерения силы отрыва F (Н – ньютон) индивидуальных полимеров (С971, ПО 50 кДа, 500 кДа), их физических смесей и поликомплексов (С971-ПО 50 кДа, С971-ПО 500 кДа) от муциновых компактов

Figure 2. Results of measuring the detachment force F (N – Newton) of individual polymers (C971, POZ 50 kDa, 500 kDa), their physical mixtures and polycomplexes (C971-POZ 50 kDa, C971-POZ 500 kDa) from mucin compacts

с образцами поли(2-этил-2-оксазолинов) способность к мукоадгезии; в то же время компакты из физических смесей и С971 уступают по показателю силы отрыва образцам ИПК. Видно, что сила отрыва образца ИПК С971-ПО 50 кДа превышает данный показатель образца аналогичной по составу ФС практически в 2 раза, что говорит о лучшей мукоадгезивной способности образца поликомплекса. Линейная корреляция прослеживается не во всех образцах, однако несмотря на наибольший показатель силы отрыва у компактов на основе поли(2-этил-2-оксазолинов), данный тип компактов не подходит для трансбуккальной пролонгированной доставки, поскольку в среде, имитирующей слюнную жидкость, происходит быстрое растворение ПО обеих молекулярных масс.

Следует отметить, что наши результаты по изучению отрыва индивидуальных полимеров от поверхности муциновых компактов противоречат данным, представленным в работе [14], а также общепринятым представлениям о влиянии заряда полимера на мукоадгезивные свойства. Полиэлектролиты, как правило, проявляют более выраженные мукоадгезивные свойства по сравнению с неионными полимерами [2]. В нашем случае образцы на основе неионных поли(2-этил-2-оксазолинов) проявляли более выраженную способность к адгезии по сравнению с образцами на основе анионного С971. По всей вероятности, такая разница обусловлена использованием муциновых компактов, а не реальной буккальной ткани животных в качестве модельного субстрата. Данные компакты при набухании могут образовывать высокопористый гель, который способствует проникновению макромолекул линейных поли(2-этил-2-оксазолинов) в большей степени по сравнению с редкосшитым С971, чья способность к диффузии сильно подавлена.

Диффузионно-транспортные свойства матриц оценивали в среде, имитирующей слюнную жидкость. На рисунке 3 представлены фотографии набухания

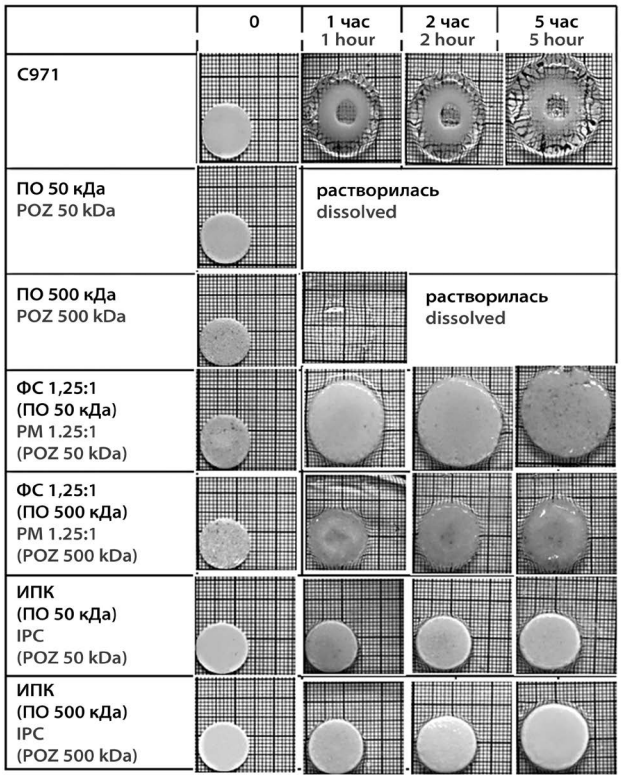


Рисунок 3. Сравнительная характеристика индивидуальных полимеров, их физических смесей и ИПК в процессе набухания в среде, имитирующей слюнную жидкость

Figure 3. Comparative characteristics of individual polymers, their physical mixtures and IPC in the process of swelling in an environment simulating salivary fluid

матриц в среде искусственной слюнной жидкости. За 5 часов матрицы поликомплексов изменились незначительно по сравнению с ФС и С971, что может обеспечить их комфортное для пациента использование в качестве носителей для буккальной доставки.

По профилям набухания матриц (рисунок 4) мы можем заметить, что матрицы на основе ПО 50 кДа, 500 кДа растворяются в течение первого часа эксперимента. Все остальные образцы исследуемых матриц выдерживают испытания и в течение 5 часов исследования не разрушаясь. Образцы ИПК и ФС равномерно набухают, С971 характеризуется высокой набухающей способностью, превышающей образцы ИПК и ФС в 3 раза. При этом, в отличие от них, карбопольные матрицы характеризуются наличием выраженного ядра и прозрачного гидрогелевого слоя вокруг, обусловленного гидратированием ионизированных карбоксильных групп редкосшитого полимера [9, 10].

Следующим этапом оценки диффузионно-транспортных свойств явилось исследование скорости высвобождения гидрофильного ЛВ – метформина из матриц на основе индивидуальных полимеров, их ФС и поликомплексов в среде, имитирующей слюнную жидкость, по методу USP IV («Проточная ячейка») с использованием специальных адаптеров для исследо-

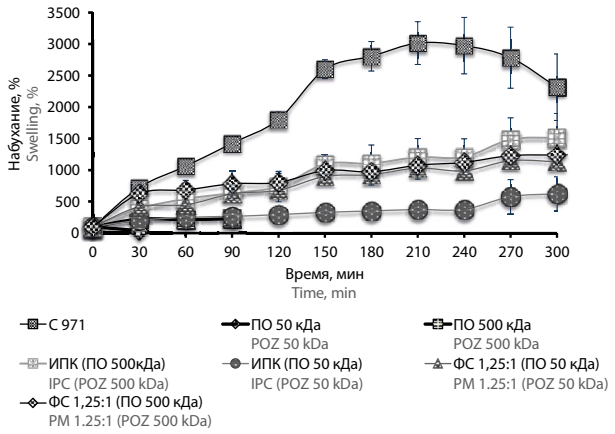


Рисунок 4. Сравнительная характеристика профилей набухания в среде, имитирующей слюнную жидкость

Figure 4. Comparative characteristics of swelling profiles in a medium simulating salivary fluid

вания мягких ЛФ (мази, кремы, гели). При выборе их в качестве модели трансбуккальной аппликации мы руководствовались не только образованием в процессе набухания исследуемых матриц гидрогелевых структур (рисунок 3), но и очевидной близостью к фактическим условиям применения, имитирующим непрерывный поток искусственной слюнной жидкости к расположенной поверх адаптера буккальной таблетке (рисунок 5).

Рисунок 5. Проточная ячейка производства ERWEKA (Германия) для исследования высвобождения из пероральных ЛФ (диаметр 22,6 мм) с помещенным в нее адаптером для исследования мягких ЛФ (мази, кремы, гели)

Figure 5. Flow-through cell made by ERWEKA (Germany) for oral dosage forms with adaptor for release evaluation of ointments, creams and gels

Как следует из рисунков 6 и 7, высвобождение ЛВ начинается с момента погружения образцов в среду, повышается на протяжении всего времени испытания и достигает максимума к концу эксперимента. Можно заметить, что наиболее полное высвобождение (более 90 %) с достижением максимума высвобождения МФ к 2 часам с последующим поддержанием достигнутой концентрации на постоянном уровне в течение ещё 3 часов исследования происходит из обеих матриц ИПК, независимо от их молекулярных

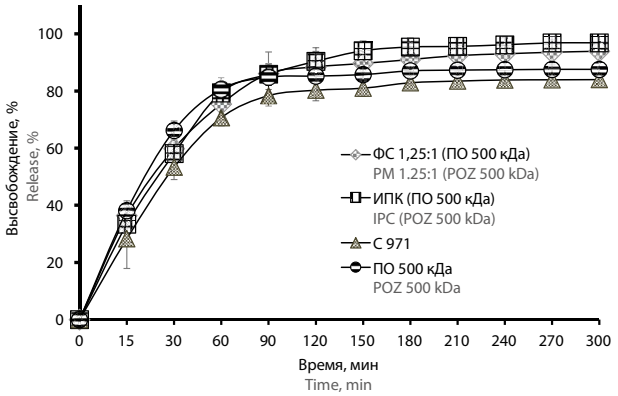


Рисунок 6. Сравнительная характеристика профилей высвобождения метформина из матриц на основе С971, ПО 500 кДа, ИПК С971-ПО 500 кДа и их физической смеси в среде, имитирующей слюнную жидкость

Figure 6. Comparative characteristics of the release profiles of metformin from matrices based on C971, POZ 500 kDa, IPC C971-POZ 500 kDa and their physical mixture in a medium simulating salivary fluid

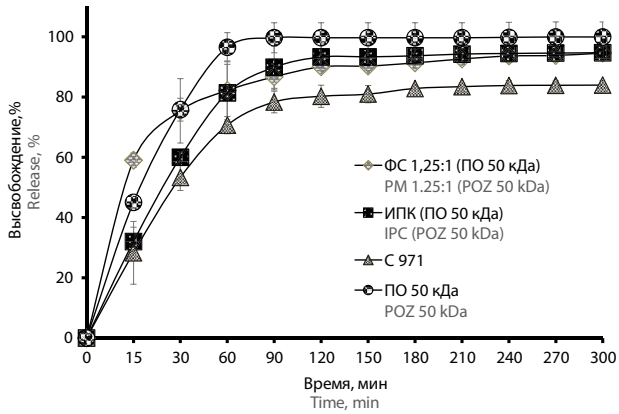


Рисунок 7. Сравнительная характеристика профилей высвобождения метформина из матриц на основе С971, ПО 50 кДа, ИПК С971-ПО 50 кДа и их физической смеси в среде, имитирующей слюнную жидкость

Figure 7. Comparative characteristics of the release profiles of metformin from matrices based on C971, POZ 50 kDa, IPC C971-POZ 50 kDa and their physical mixture in a medium simulating salivary fluid

масс, по сравнению с матрицами ФС и индивидуальных полимеров.

Изученные диффузионно-транспортные свойства таблетированных матриц в имитирующей слюну среде показывают перспективность использования ИПК на основе С971 и ПО в качестве носителей для трансбуккальной доставки. Однако несмотря на сопоставимую набухающую способность и выраженные мукоадгезивные свойства сравниваемых поликомплексных матриц, только компакты на основе ИПК с ПО 50 кДа практически не увеличиваются в размере, что с учетом экономически лучшей доступности ПО 50 кДа делает именно этот носитель более предпочтительным для использования в системах трансбуккальной доставки метформина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном исследовании мукоадгезивных свойств образцов полимеров компакты ИПК С971-ПО 50 кДа, С971-ПО 500 кДа показали сопоставимую с поли(2-этил-2-оксазолинами) способность к мукоадгезии. При оценке набухающей способности матрицы поликомплексов изменились незначительно по сравнению с физическими смесями индивидуальных полимеров и карбополом, что может обеспечить их комфортное для пациента использование в качестве носителей для буккальной доставки. При оценке высвобождения метформина предлагаемым нами методом «проточная ячейка» с использованием специальных адаптеров для исследования мягких ЛФ (мазей, кремов, гелей) наиболее полное высвобождение (более 90 %) происходит из обеих поликомплексных матриц по сравнению с матрицами физических смесей и индивидуальных полимеров. Предлагаемый вариант позволяет произвести оценку высвобождения ЛВ в адекватно приближенных к естественным условиям функционирования трансбуккальных систем доставки. По совокупности оцененных свойств перспективным с точки зрения дальнейшего изучения в качестве носителя для создания буккальных таблеток рекомендован ИПК С971-ПО 50 кДа.

ЛИТЕРАТУРА

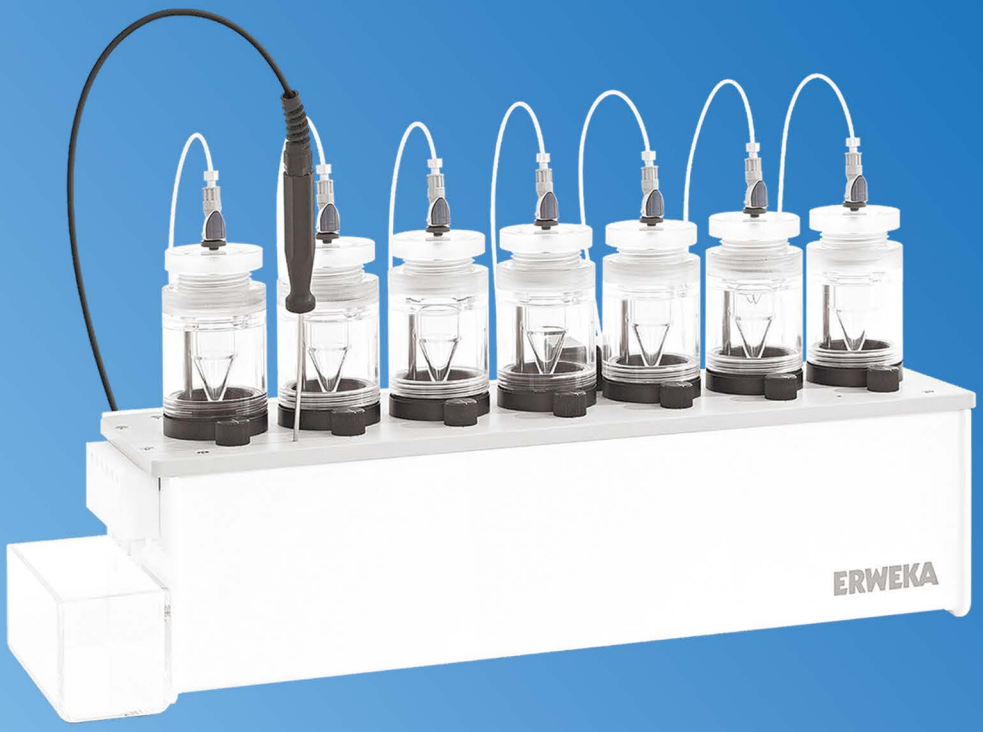
1. Pather S. I., Rathbone M. J., Senel S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008;5(5):531–542.
2. Khutoryanskiy V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11:748–764.
3. Tan Y. T., Peh K. K., Al-Hanba O. Investigation of interpolymer complexation between Carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2001;4:7–14.
4. Nguyen H. V., Nguyen V. H., Lee B.-J. Dual release and molecular mechanism of bilayered aceclofenac tablet using polymer mixture. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;515:233–244.
5. Satoh K., Takayama K., Machida Y., Suzuki Y., Nakagaki M., Nagai T. Factors affecting the bioadhesive properties property of tablets consisting of hydroxypropyl cellulose and carboxyvinyl polymer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1989;37:1366–1368.
6. Takayama K., Nagai T. Application of interpolymer complexation of polyvinylpyrrolidone/carboxyvinyl polymer to control of drug release. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1987;35(12):4921–4927.
7. Nurkeeva Z. S., Mun G. A., Dubolazov A. V., Khutoryanskiy V. V. pH-effects on the complexation, miscibility and radiation-induced cross-linking in poly(acrylic acid)-poly(vinyl alcohol) blends. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5:424–432.
8. Nurkeeva Z. S., Mun G. A., Khutoryanskiy V. V., Bitekenova A. B., Dubolazov A.V., Esirkegenova S.Zh. pH effects in the formation of interpolymer complexes between poly(N-vinylpyrrolidone) and poly(acrylic acid) in aqueous solutions. *The European Physical Journal E*. 2003; 10: 65-68.
9. Мустафин Р. И., Семина И. И., Гарипова В. Р., Буховец А. В., Ситенков А. В., Салахова А. Р., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Сравнительное исследование поликомплексов на основе Carbopol® и противоположно заряженных полиэлектролитов как новых систем пероральной доставки. *Химико-фармацевтический журнал*. 2015;49(1):3–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-1-3-8.
10. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(2):85. DOI:10.3390/polym10010085.
11. Гордеева Д. С., Ситенкова (Буховец) А. В., Мустафин Р. И. Интерполиэлектролитные комплексы на основе сополимеров Eudragit® как носители для систем биоадгезивной гастроретентивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. в. 2020;9(2):72–76. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
12. Мустафин Р. И., Будников В. В., Абдуллина С. Г., Насибуллин Ш. Ф., Салеев Р. А. Поликомплексный носитель для трансбуккальной мукоадгезивной доставки метронидазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):83–90. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90.
13. Moustafine R. I., Viktorova A. S., Khutoryanskiy V. V. Interpolymer complexes of Carbopol® 971 and poly(2-ethyl-2-oxazoline): Physicochemical studies of complexation and formulations for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;558;53–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.002.
14. Ruiz-Rubio L., Alonso M. L., Pérez-Álvarez L., Alonso R. M., Vilas J. L., Khutoryanskiy V. V., Formulation of Carbopol®/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)s mucoadhesive tablets for buccal delivery of hydrocortisone. *Polymers*. 2018;10(2):175. DOI: 10.3390/polym10020175.
15. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы. *Химико-фармацевтический журнал*. 2009;43(4):21–29. DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29.
16. Hoogenboom R. Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48:7978–7994. DOI: 10.1002/anie.200901607.
17. Khutoryanskiy V. V. Beyond PEGylation: alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;124:140–149. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.015.
18. Claeys B., Vervaeck A., Vervaet C., Remon J. P., Hoogenboom R., De Geest B. G. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as matrix excipient for drug formulation by hot melt extrusion and injection molding. *Macromolecular Rapid Communications*. 2012;33:1701–1707. DOI: 10.1002/marc.201200332.
19. Fael H., Rafols C., Demirel A. L. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as an alternative to poly(vinylpyrrolidone) in solid dispersions for solubility and dissolution rate enhancement of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107:2428–2438. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.05.015.
20. Shan X., Williams A. C., Khutoryanskiy V. V. Polymer structure and property effects on solid dispersions with haloperidol: poly(N-vinyl pyrrolidone) and poly(2-oxazolines) studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119884.
21. Morales J. O., McConville J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77:187–199.
22. Kamel R., Mahmoud A., El-Feky G. Double-phase hydrogel for buccal delivery of tramadol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2012;38(4):468–483.
23. Abruzzo A., Bigucci F., Cerchiara T., Cruciani F., Vitali B., Luppi B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87:581–588.
24. Kianfar F., Ayensu I., Boateng J. S. Development and physico-mechanical characterization of carrageenan and poloxamer-based lyophilized matrix as a potential buccal drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013. DOI: 10.3109/03639045.2012.762655
25. Мустафин Р. И., Буховец А. В., Протасова А. А., Шайхрамова Р. Н., Ситенков А. Ю., Семина И. И. Сравнительное исследование поликомплексных систем для гастроретентивной доставки метформина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2015;1(10):48–51.
26. Çelik B. Resperidone mucoadhesive buccal tablets: formulation design, optimization and evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:3355–3365. DOI: 10.2147/DDDT.S150774.
27. Esim O., Savaser A., Ozkan C. K., Bayrak Z., Tas C., Ozkan Y. Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26:53–63. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.10.013

28. Ambrogi V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rossi C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2004;95(3):521–533. DOI:10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
29. Peddapalli H., Bakshi V., Boggula N. Formulation, in vitro and ex vivo characterization of mucoadhesive buccal tablets for antihypertensive drug. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(8):402–411. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i8.26126.
30. Wang K., Liu T., Lin R., Liu B., Yang G., Bu X., Wang W., Zhang P., Zhou L., Zhang J. Preparation and in vitro release of buccal tablets of naringenin-loaded MPEG-PCL nanoparticles. *RSC Advances*. 2014;4:33672–33679. DOI: 10.1039/c4ra04920a.
31. Киржанова Е. А., Хуторянский В. В., Балабушевич Н. Г., Харенко А. В., Демина Н. Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2014;3(8):66–80.

REFERENCES

1. Pather S. I., Rathbone M. J., Senel S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008;5(5):531–542.
2. Khutoryanskiy V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11:748–764.
3. Tan Y. T., Peh K. K., Al-Hanba O. Investigation of interpolymer complexation between Carbopol and various grades of polyvinylpyrrolidone and effects on adhesion strength and swelling properties. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2001;4:7–14.
4. Nguyen H. V., Nguyen V. H., Lee B.-J. Dual release and molecular mechanism of bilayered aceclofenac tablet using polymer mixture. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;515:233–244.
5. Satoh K., Takayama K., Machida Y., Suzuki Y., Nakagaki M., Nagai T. Factors affecting the bioadhesive properties property of tablets consisting of hydroxypropyl cellulose and carboxyvinyl polymer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1989;37:1366–1368.
6. Takayama K., Nagai T. Application of interpolymer complexation of polyvinylpyrrolidone/carboxyvinyl polymer to control of drug release. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1987;35(12):4921–4927.
7. Nurkeeva Z. S., Mun G. A., Dubolazov A. V., Khutoryanskiy V. V. pH-effects on the complexation, miscibility and radiation-induced cross-linking in poly(acrylic acid)-poly(vinyl alcohol) blends. *Macromolecular Bioscience*. 2005;5:424–432.
8. Nurkeeva Z. S., Mun G. A., Khutoryanskiy V. V., Bitekenova A. B., Dubolazov A.V., Esirkegenova S.Zh. pH effects in the formation of interpolymer complexes between poly(N-vinylpyrrolidone) and poly(acrylic acid) in aqueous solutions. *The European Physical Journal E*. 2003; 10: 65-68.
9. Mustafin R. I., Semina I. I., Garipova V. A., Bukhovets A. V., Sitenkov Y. A., Salakhova A. R., Gennari C. G. M., Cilurzo F. Comparative study of polycomplex oral drug delivery systems based on Carbopol™ and oppositely charged polyelectrolytes. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(1):3–8. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2015-49-1-3-8.
10. Garipova V. R., Gennari C. G. M., Selmin F., Cilurzo F., Moustafine R. I. Mucoadhesive Interpolyelectrolyte Complexes for the Buccal Delivery of Clobetasol. *Polymers*. 2018;10(2):85. DOI:10.3390/polym10010085.
11. Gordeeva D. S., Sitenkova (Bukhovets) A. V., Moustafine R. I. Interpolyelectrolyte complexes based on Eudragit® copolymers as carriers for bioadhesive gastroretentive metronidazole delivery system. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):72–76. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-72-76.
12. Moustafine R. I., Budnikov V. V., Abdullina S. G., Nasibullin S. F., Saleev R. A. Polycomplex carrier for buccal mucoadhesion delivery of metronidazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):83–90. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-83-90.
13. Moustafine R. I., Viktorova A. S., Khutoryanskiy V. V. Interpolymer complexes of Carbopol® 971 and poly(2-ethyl-2-oxazoline): Physicochemical studies of complexation and formulations for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;558;53–62. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.002.
14. Ruiz-Rubio L., Alonso M. L., Pérez-Álvarez L., Alonso R. M., Vilas J. L., Khutoryanskiy V. V., Formulation of Carbopol®/Poly(2-ethyl-2-oxazoline)s mucoadhesive tablets for buccal delivery of hydrocortisone. *Polymers*. 2018;10(2):175. DOI: 10.3390/polym10020175.
15. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2009;43(4):21–29. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2009-43-4-21-29 (in Russ.).
16. Hoogenboom R. Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009;48:7978–7994. DOI: 10.1002/anie.200901607.
17. Khutoryanskiy V. V. Beyond PEGylation: alternative surface-modification of nanoparticles with mucus-inert biomaterials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;124:140–149. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.015.
18. Claeys B., Vervaeck A., Vervaet C., Remon J. P., Hoogenboom R., De Geest B. G. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as matrix excipient for drug formulation by hot melt extrusion and injection molding. *Macromolecular Rapid Communications*. 2012;33:1701–1707. DOI: 10.1002/marc.201200332.
19. Fael H., Rafols C., Demirel A. L. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as an alternative to poly(vinylpyrrolidone) in solid dispersions for solubility and dissolution rate enhancement of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;107:2428–2438. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.05.015.
20. Shan X., Williams A. C., Khutoryanskiy V. V. Polymer structure and property effects on solid dispersions with haloperidol: poly(N-vinyl pyrrolidone) and poly(2-oxazolines) studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;590:119884.
21. Morales J. O., McConville J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77:187–199.
22. Kamel R., Mahmoud A., El-Feky G. Double-phase hydrogel for buccal delivery of tramadol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2012;38(4):468–483.
23. Abruzzo A., Bigucci F., Cerchiara T., Cruciani F., Vitali B., Luppi B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87:581–588.
24. Kianfar F., Ayensu I., Boateng J. S. Development and physico-mechanical characterization of carrageenan and poloxamer-based lyophilized matrix as a potential buccal drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2013. DOI: 10.3109/03639045.2012.762655
25. Mustafin R. I., Bukhovets A. V., Protasova A. A., Shaykhramova R. N., Sitenkov A. Y., Semina I. I. Comparative investigation of polycomplex systems for gastroretentive metformin delivery. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2015;1(10):48–51. (in Russ.).
26. Çelik B. Resperidone mucoadhesive buccal tablets: formulation design, optimization and evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*. 2017;11:3355–3365. DOI: 10.2147/DDDT.S150774.
27. Esim O., Savaser A., Ozkan C. K., Bayrak Z., Tas C., Ozkan Y. Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018;26:53–63. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.10.013
28. Ambrogi V., Rubini D., Giovagnoli S., Ricci M., Blasi P., Rossi C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*. 2004;95(3):521–533. DOI:10.1016/j.jconrel.2003.12.018.
29. Peddapalli H., Bakshi V., Boggula N. Formulation, in vitro and ex vivo characterization of mucoadhesive buccal tablets for antihypertensive drug. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018;11(8):402–411. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i8.26126.
30. Wang K., Liu T., Lin R., Liu B., Yang G., Bu X., Wang W., Zhang P., Zhou L., Zhang J. Preparation and in vitro release of buccal tablets of naringenin-loaded MPEG-PCL nanoparticles. *RSC Advances*. 2014;4:33672–33679. DOI: 10.1039/c4ra04920a.
31. Kirzhanova E. A., Khutoryanskiy V. V., Balabushevich N. G., Kharenko A. V., Demina N. B. Methods for analysis of mucoadhesion: from basic research to practical applications in dosage forms development. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2014;3(8):66–80. (In Russ.).

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

ООО «ЭРВЕКА»
Тел.: +7 (499) 110 90 60
E-mail: sales@erweka.ru

ERWEKA

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-57-66
УДК 615.1

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

Системы доставки офтальмологических препаратов (обзор)

Е. О. Бахрушина[1], М. Н. Анурова[1]*, Н. Б. Демина[1], И. В. Лапик[1], А. Р. Тураева[1], И. И. Краснюк[1]

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

***Контактное лицо:** Анурова Мария Николаевна. **E-mail:** amn25@yandex.ru

ORCID: Е. О. Бахрушина – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; М. Н. Анурова – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; И. В. Лапик – https://orcid.org/0000-0002-1590-7268; А. Р. Тураева – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574; И. И. Краснюк – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Статья поступила: 26.10.2020. **Статья принята в печать:** 14.12.2020. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Эффективная доставка офтальмологических лекарственных препаратов является сложной задачей. Глаз имеет целый ряд защитных систем и физиологических барьеров, из-за чего офтальмологические ЛФ имеют низкую биодоступность, обычно не превышающую 5 %. Местное применение лекарственных препаратов – относительно простое для использования и наиболее часто назначаемое врачами для лечения офтальмологических заболеваний, особенно переднего сегмента глаза. Однако при использовании традиционных систем доставки возникает ряд проблем: нарушение пациентами техники введения лекарственных средств и, как следствие, снижение комплаентности лечения, ограничение доставки лекарственных препаратов к целевым тканям глаза из-за низкой проницаемости эпителия и быстрого клиренса после введения препарата. Поддержание постоянного терапевтического уровня препарата еще одна проблема, с которой традиционные системы доставки зачастую не справляются.

Текст. В статье рассмотрены виды офтальмологических систем доставки. Традиционные представлены такими лекарственными формами, как глазные капли, мази, гели. Современные офтальмологические лекарственные формы представлены глазными пленками, контактными линзами и глазными имплантатами. Приведены характеристика, достоинства и недостатки каждого вида систем доставки и их перспективные направления развития, а также современные разработки в этой области.

Заключение. В настоящее время большая часть научных исследований по разработке офтальмологических систем доставки посвящена получению лекарственных форм, способных поддерживать постоянную концентрацию АФИ в ткани-мишени, обеспечивающих транспорт действующих компонентов к ним. Это достигается использованием современных достижений в области нанотехнологий и химии полимеров. Получают жидкие и мягкие лекарственные формы с микро-, нано- и микро-нано-носителями. Активно разрабатываются и изучаются полимерные системы доставки, такие как пленки, линзы и имплантаты. Развитие современных технологических подходов открывает новые возможности для терапии широкого круга офтальмологических заболеваний за счет снижения побочных эффектов, часто индуцируемых собственной токсичностью молекул, снижения частоты вводимой дозы и поддержания фармакологического профиля лекарственного препарата. Таким образом, использование современных офтальмологических систем доставки способно существенно ограничить применение инвазивных методов лечения.

Ключевые слова: офтальмологические системы доставки, глазные лекарственные формы, капли, гели, наносистемы, глазные пленки, глазные имплантаты, упаковка.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, Н. Б. Демина, И. И. Краснюк разработали концепцию и методологию исследования. Е. О. Бахрушина, И. В. Лапик, А. Р. Тураева занимались сбором и анализом литературных данных. Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, Н. Б. Демина участвовали в написании текста статьи. Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова, И. В. Лапик занимались обработкой данных. И. И. Краснюк руководил работой. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Лапик И. В., Тураева А. Р., Краснюк И. И. Системы доставки офтальмологических препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):57–66. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-57-66

Ophthalmic Drug Delivery Systems (Review)

Elena O. Bakhrushina[1], Maria N. Anurova[1]*, Natalia B. Demina[1], Ivan V. Lapik[1], Anastasia R. Turaeva[1], Ivan I. Krasnuk[1]

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:** Maria N. Anurova. **E-mail:** amn25@yandex.ru

ORCID: Elena O. Bakhrushina – https://orcid.org/0000-0001-8695-0346; Maria N. Anurova – https://orcid.org/0000-0002-7649-9616; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Ivan V. Lapik – https://orcid.org/0000-0002-1590-7268; Anastasia R. Turaeva – https://orcid.org/0000-0003-0707-4574; Ivan I. Krasnuk – https://orcid.org/0000-0002-7242-2988.

Received: 26.10.2020. **Revised:** 14.12.2020. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Effective delivery of ophthalmic drugs is challenging. The eye has a number of protective systems and physiological barriers, which is why ophthalmic dosage forms have a low bioavailability, usually not exceeding 5 %. Topical drug administration is relatively easy to use and is most commonly prescribed by physicians for the treatment of ophthalmic diseases, especially the anterior segment of the eye. However, when using traditional delivery systems, a number of problems arise: patients' violation of the drug administration technique, and, as a consequence, a decrease in treatment compliance, restriction of drug delivery to the target eye tissues due to low epithelial permeability and rapid clearance after drug administration. Maintaining a constant therapeutic drug level is another challenge that traditional delivery systems often fail to cope with.

Text. The article discusses the types of ophthalmic delivery systems. Traditional ones are represented by such dosage forms as eye drops, ointments, gels. Modern ophthalmic dosage forms are represented by: eye films, contact lenses and eye implants. The characteristics, advantages and disadvantages of each type of delivery systems and their promising directions of development, as well as modern developments in this area are given.

© Бахрушина Е. О., Анурова М. Н., Демина Н. Б., Лапик И. В., Тураева А. Р., Краснюк И. И., 2021
© Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Demina N. B., Lapik I. V., Turaeva A. R., Krasnuk I. I., 2021

Conclusion. Currently, most of the scientific research on the development of ophthalmic delivery systems is devoted to obtaining dosage forms capable of maintaining a constant concentration of the drug in the target tissue, providing the transport of active ingredients to them. This is achieved by using modern advances in nanotechnology and polymer chemistry. Receive liquid and soft dosage forms with micro-, nano- and micro-nano-carriers. Polymeric delivery systems such as films, lenses and implants are being actively developed and studied. The development of modern technological approaches opens up new possibilities for the treatment of a wide range of ophthalmic diseases by reducing the side effects often induced by the intrinsic toxicity of molecules, reducing the frequency of the administered dose and maintaining the pharmacological profile of the drug. Thus, the use of modern ophthalmic delivery systems can significantly limit the use of invasive treatments.

Keywords: ophthalmic delivery systems, ophthalmic dosage forms, drops, gels, nanosystems, ocularinserts, ophthalmic implants, packaging.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova, Natalia B. Demina, Ivan I. Krasnyuk developed the concept and research methodology. Elena O. Bakhrushina, Ivan V. Lapik, Anastasia R. Turaeva were engaged in the collection and analysis of literature data. Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova, Natalia B. Demina participated in writing the text of the article. Elena O. Bakhrushina, Maria N. Anurova, Ivan V. Lapik were engaged in data processing. Ivan I. Krasnyuk supervised the work. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Bakhrushina E. O., Anurova M. N., Demina N. B., Lapik I. V., Turaeva A. R., Krasnuk I. I. Ophthalmic drug delivery systems. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):57–66. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-57-66

ВВЕДЕНИЕ

В современной офтальмологии особенно остро стоит вопрос *комплаентности* пациентов с такими хроническими заболеваниями, как глаукома, катаракта, возрастная макулярная дегенерация, синдром сухого глаза. Согласно опубликованным данным, главными проблемами, препятствующими высокой приверженности пациентов лечению, являются несвоевременное обращение к специалисту, нерегулярный прием прописанного медикамента, микробная контаминация препарата, а также проблемы с правильностью *инстилляции* [1, 2].

Таким образом, для повышения приверженности пациентов терапии офтальмологических заболеваний приобретают актуальность разработки в сфере создания новых глазных лекарственных форм (ЛФ) и их современной упаковки [1–4].

ИСТОРИЯ

Местное введение лекарств через органы зрения путем инстилляции в конъюнктивальный мешок или аппликации на веке практиковалось еще с древних времен. Рецептуры глазных форм были найдены на египетских папирусах, а между 20 г. до н. э. и 50 г. н. э. греки и римляне практиковали доставку необходимых компонентов глазных ЛФ, растворив их в воде, молоке или яичном белке. Для полученной жидкой ЛФ использовали термин «*коллирия*» [5]. В Средневековье коллирии использовались в косметических целях: с их помощью проводили инстилляцию атропином для расширения зрачков. Впоследствии именно римские коллирии дали начало развитию современной ЛФ «глазные капли» [6]. Вплоть до 40-х годов XX века офтальмологические препараты изготавливались исключительно в условиях аптечного производства и были предназначены для применения непосредственно после получения [6]. В 1953 году FDA приняло положение, согласно которому все нестерильные офтальмологические препараты признавались фальсифицированными, а в 1955 году требование стерильности было включено в американскую фармакопею [7]. Первый офтальмологический препарат в ЛФ, отличной от истинного раствора, был создан и впоследствии коммерциализирован в 1950-х годах. Таким препаратом стала *суспензия* кортизона ацетата, что привело к расширению ассортимента данной группы ЛФ [8].

Следующим этапом стало открытие в 1982 году японскими исследователями S. Hosaka и др. эффективности и пролонгированного эффекта *глазных гелей* тимолола малеата на основе геллановой и ксантановой камедей [9]. В начале и середине 90-х годов XX века была доказана роль гелеобразователей в модифицированном высвобождении активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) и увеличении комплаентности пациентов терапии с использованием таких препаратов [10]. Введение полимеров в состав офтальмологических препаратов позволило увеличить время контакта АФИ с поверхностью роговицы, что увеличило ее биодоступность. В 1997 году K. J. Sullivan и др. впервые отметили позитивную роль гелеобразователя *карбомера* в устранении синдрома сухого глаза [11].

СОВРЕМЕННЫЕ ВЕКТОРЫ РАЗРАБОТКИ ГЛАЗНЫХ ЛФ

Несмотря на широкий ассортимент офтальмологических ЛФ, перед современными исследователями стоит вопрос преодоления низкой биодоступности офтальмологических лекарственных препаратов (ЛП), которая составляет от 0,5 до 5 % [12]. Причиной этого является непродолжительный контакт ЛФ с конъюнктивой глава при инстилляции, сложная анатомическая структура глаза, малая абсорбирующая поверхность роговицы и пофильность эпителия, метаболизм, ферментация, связывание АФИ с белками, содержащимися в слезной жидкости, а также

защитные механизмы: образование слез, мигание и поток вещества через носоглоточный канал [13]. Низкая емкость конъюнктивального мешка (приблизительно 30 мкл без моргания), всасывание из пальпебральной конъюнктивы (выстилающей внутреннюю сторону век) и защитные механизмы вызывают снижение концентрации АФИ и сокращают время, в течение которого ингредиент остается в месте абсорбции [14]. На биодоступность офтальмологических препаратов также влияют pH, химическая структура АФИ, ЛФ, используемый растворитель, осмоляльность, вязкость препарата [1, 12].

Офтальмологические системы доставки ЛС контактируют со слезной жидкостью и тканями глазной поверхности. Слезная жидкость (7 мкл) образует тонкий слой, состоящий из трех частей: наружного липидного слоя (200 Нм), водного слоя (3–7 мкм), содержащего муцины и другие растворимые белки, и муцинсодержащего гелевого слоя (1 мкм). Низкомолекулярные соединения проникают через роговицу и конъюнктиву путем пассивной диффузии (трансцеллюлярно и/или парацеллюлярно). В конъюнктиву могут проникать соединения с молекулярной массой до 5 кДа, тогда как склера допускает прохождение макромолекул с молекулярной массой до 100 кДа [12].

АССОРТИМЕНТ ГЛАЗНЫХ ЛФ

Офтальмологические ЛС для местного применения могут назначаться в виде аппликаций на кожу век, введения в конъюнктивальный мешок, инъекций в ткани глаза (переднюю и заднюю камеры, стекловидное тело) и окружающие ткани. Согласно ОФС «Глазные лекарственные формы» *к жидким ЛФ* для применения в офтальмологии относятся: капли, представляющие собой растворы/суспензии/эмульсии, растворы для промывания глаз (глазные примочки), растворы для субконъюктивального, парабульбарного и внутриглазного введения; к *мягким ЛФ*: глазные мази, глазные гели, глазные кремы; к *твердым ЛФ:* порошки и таблетки для приготовления глазных растворов, глазные пленки, глазные имплантаты.

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано более 350 ЛП для применения в офтальмологии. 89 % препаратов представлены в ЛФ капель, 10 % приходится на долю мягких ЛФ, из которых 19 % приходится на долю глазных гелей.

Новые формы систем доставки, исследования которых активно ведутся в последние годы, включают в себя микроэмульсии, растворы наночастиц, многокомпонентные системы-носители, глазные пленки, линзы, коллагеновые экраны, а также так называемые гели *in situ* – растворы полимеров, гелеобразование которых происходит на слизистой оболочке [3, 4, 13, 14]. На фармацевтическом рынке США и Европы также присутствуют лекарственные композиции в форме офтальмологических микро-таблеток для закладывания за веко и офтальмологических спреев [15–17].

ГЛАЗНЫЕ КАПЛИ

Глазные капли являются старейшей и наиболее распространенной глазной ЛФ. При инстилляции глазных капель ЛС быстро всасывается из конъюнктивальной полости, при этом всасывание зависит от его растворимости, концентрации (растворы с высокой концентрацией всасываются быстрее) и pH. Основными недостатками глазных капель являются непродолжительное воздействие на слизистую оболочку, эвакуация ЛФ со слизистой и большой расход ЛП.

Одним из перспективных методов увеличения биодоступности АФИ в составе глазных капель является введение в их состав специфических пенетраторов, например циклодекстринов, краун-эфиров, хелатирующих агентов, сурфактантов и др. [18].

Циклодекстрины – это циклические олигосахариды, образующие комплексные соединения с АФИ, тем самым увеличивая их растворимость без изменения молекулярной структуры. Циклодекстрины позволяют удерживать гидрофобные ЛС в растворе и переносить их на поверхность биомембран [18, 19]. В офтальмологических препаратах оптимальная биодоступность АФИ достигается при концентрации циклодекстринов (<15 %) в растворе. Наиболее часто используемым циклодекстрином является 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин, который не оказывает раздражающего действия. Разработаны и коммерциализированы глазные капли, содержащие комплексы дексаметазона и пилокарпина с 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином – эти препараты хорошо переносятся и обеспечивают более высокую биодоступность по сравнению с обычными глазными каплями [18–21].

Краун-эфиры представляют собой синтетические циклические олигомеры этиленоксида, состоящие из связанных эфирных групп. Свое название краун-эфиры получили благодаря характерной форме молекулы. Эти соединения способны образовывать комплексы с ионами металлов, а также с нейтральными и ионными органическими молекулами, а их комплексы обладают способностью проникать через биологические мембраны. Амфифильность молекулы краун-эфиров делает их идеальными кандидатами для введения в состав офтальмологических систем доставки в качестве усилителей проницаемости. В работе Morrisonetal [22] изучали возможность применения краун-эфиров 12С4, 15С5 и 18С6 для использования в офтальмологических системах доставки рибофлавина, в результате чего растворимость АФИ увеличилась в водном растворе до 46 % *in vitro*, потенциально увеличивая проникновение рибофлавина в роговицу крупного рогатого скота [18, 22].

К потенциально перспективным носителям для использования в глазных каплях относятся также *микроэмульсии*. Микроэмульсии относительно просты в производстве, могут подвергаться стерилизации, являются кинетически стабильными коллоидными системами. Они широко используются в качестве

систем доставки благодаря их способности растворять как липофильные, так и гидрофильные ЛС, а также увеличивать биодоступность АФИ. Для создания микроэмульсий используются такие неионные ПАВ, как твины и спены (твин-80 и спен-60), являющиеся гипоаллергенными и нетоксичными сурфактантами, разрешенными для применения в офтальмологии. Клинические исследования показали эффективность и высокую биодоступность препаратов, применяемых в форме офтальмологических микроэмульсий. АФИ, для которых были разработаны микроэмульсионные глазные капли, – антибиотики хлорамфеникол, максифлоксацин, циклоспорин А, а также флурбипрофен [23–25].

Для увеличения биодоступности АФИ и защиты его от ферментов эпителия роговицы применяют также *липосомы*. Липосомы – сферические соединения, образующиеся в растворах АФИ и фосфолипидов, обычно состоящие, например, из фосфатидилхолина, стеариламина и различных концентраций холестерина или лецитина и α-L-дипальмитоилфосфатидилхолина. К преимуществам липосом относятся: биосовместимость, биоразлагаемость, амфифильные свойства и низкая токсичность. Эффективность доставки АФИ из липосом зависит от многих факторов, а именно: эффективности инкапсуляции, размера и заряда липосом, стабильности липосом в конъюнктивальном мешке и сродства к поверхности роговицы. Липосомы, заряженные положительно, по сравнению с заряженными отрицательно и нейтрально проявляют более высокую аффинность к отрицательно заряженной поверхности роговицы и мукогликопротеинов конъюнктивы, из-за чего они замедляют выведение АФИ из места применения. Для увеличения адгезии отрицательно и нейтрально заряженных липосом к поверхности роговицы или конъюнктивы предложено введение липосомных суспензий в мукоадгезивные гели или их комбинации с мукоадгезивными полимерами. В настоящее время офтальмологические препараты на основе липосом разработаны для таких АФИ, как ацикловир, пилокарпин, ацетазоламид, хлорамфеникол и ципрофлоксацин [25–29].

ГЛАЗНЫЕ МЯГКИЕ ЛФ

Мягкие глазные ЛФ предназначены для нанесения на конъюнктиву (мази и кремы), а также на веки и роговицу (гели). Мягкие ЛФ используют в офтальмологической практике для обеспечения местного действия – ЛФ востребованы для создания препаратов антибиотиков и гормональных препаратов, противовирусных, противогрибковых средств, препаратов регенерирующего действия и т. д. К недостаткам этих ЛФ можно отнести временное снижение остроты зрения после их нанесения.

Наиболее перспективной офтальмологической мягкой ЛФ являются гели. К их недостаткам можно отнести неудобство дозирования [1]. Применение гелей *in situ* позволяет сочетать удобство применения и новые технологии доставки жидких ЛФ с преимуществами, характерными для мягких ЛФ [3]. Гели *in situ* представляют собой вязкие жидкости, демонстрирующие способность осуществлять золь-гель-переход при воздействии внешних факторов, таких как соответствующий pH, температура и присутствие электролитов. Дозирование этой ЛФ проводится с использованием всех возможных вариантов упаковки жидких ЛФ, что обеспечит точность дозирования и удобство инстилляции. После аппликации на роговицу ЛФ меняет свои реологические характеристики, из жидкого переходя в вязко-пластичное состояние. Это свойство приводит к замедлению дренирования лекарств с поверхности роговицы и увеличению биодоступности АФИ. К полимерам, способным обеспечить средазависимый золь-гель-переход на слизистой оболочке глаза, относятся полоксамеры, геллановая и ксантановая камеди, соли альгиновой кислоты, ацетатфталат целлюлозы. Разработки составов гелей *in situ* ведутся для создания препаратов гидрохлорида ципрофлоксацина, малеататимолола, флуконазола, ацикловира и пилокарпина [30–32].

Геллановая камедь имеет большой потенциал в качестве эксципиента для создания систем офтальмологической доставки в смеси с другими полимерами благодаря увеличенному времени экспозиции препарата на слизистой и досказанной большей биодоступности АФИ [33]. Химическая модификация геллановой камеди (к примеру, метакрилирование) приводит к усилению терапевтического эффекта АФИ в составе системы доставки, как было показано L. E. Agibayeva et al. [34] в исследовании *in vivo* систем доставки гидрохлорида пилокарпина, содержащими геллановую камедь и ее метакрилированные производные.

Еще одним перспективным направлением развития глазных гелей является включение в состав микро-, нано- или микро-нано-носителей. Благодаря этой комбинации удается добиться пролонгированного и контролируемого высвобождения, увеличения биодоступности и защитить АФИ от ферментативного метаболизма, присутствующего на слизистой оболочке глаза. Используя положительно заряженные биоадгезивные полимеры, можно добиться усиления взаимодействия с отрицательными зарядами на поверхности роговицы и для увеличения времени прекорнеального пребывания и абсорбции препарата [35–37]. Например, показано, что наночастицы, включенные в гели, изготовленные из хитозана или поли-ε-капролактона, показали увеличение биодоступности целекоксиба в 25 раз по сравнению с суспензией целекоксиба у крыс. Кроме того, увеличивалась концентрация целекоксиба как в передних, так и в задних сегментах глаза [37]. Гидрогель карбомера 934 с наночастицами пропрофена из полиэфира полилактигликолида показал значительное увеличение проницаемости роговицы и меньшее раздражающее действие по сравнению с коммерческими каплями пророфена [36].

ГЛАЗНЫЕ ПЛЕНКИ

Глазные пленки (*ocularinserts*) – общепринятый современными фармакопеями термин, объединяющий широкий ассортимент твердых ЛФ, предназначенных к введению в конъюктивальную полость. В частности, к глазным пленкам относятся глазные линзы, коллагеновые экраны, глазные терапевтические системы [14].

В качестве ЛФ пленки известны с 60-х годов XX века [38]. В СССР сотрудниками Всесоюзного научно-исследовательского и испытательного института медицинской техники совместно с сотрудниками Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца были созданы и успешно апробированы глазные лекарственные пленки с сульфапиридазином, неомицина сульфатом, канамицином и другими АФИ. Пленки с пилокарпином, зарегистрированные в СССР в 1980 году, обладали пролонгированным гипотензивным действием, хорошо переносились пациентами за счет небольшого размера и имели преимущества перед глазными каплями пилокарпина [39].

Глазные пленки менее восприимчивы к физиологическим защитным механизмам глаза, таким как отток через носоглоточный канал, способны оставаться в конъюнктивальном мешке на более длительный период по сравнению с традиционными жидкими и мягкими глазными ЛФ, более стабильны. Их несомненными преимуществами являются также точность дозирования, возможность пролонгированного высвобождения АФИ и минимизирование системного эффекта и, как следствие, системного побочного действия. Более того, их использование позволяет снизить частоту применения препарата, а также нечёткость зрения, характерную для применения мягких офтальмологических ЛФ. Высвобождение АФИ из глазных пленок осуществляется благодаря равномерной диффузии из пленки в слезную жидкость с постоянной скоростью в течение заданного времени. К недостаткам глазных пленок можно отнести ощущение постороннего тела в глазу при их введении, трудности при введении ЛФ, возможность незаметного выведения пленки из глаза. Применение глазных пленок требует специального инструктажа и обучения пациентов [14, 38].

На разработке систем доставки в форме глазных пленок сфокусированы исследования ведущих компаний, специализирующихся на офтальмологических препаратах (Alcon, Bausch & Lomb Incorporated, Jonson & Jonson). Современные коммерциализированные разработки представлены коллагеновыми экранами (или раствором колласом), глазными пленками на основе производных целлюлозы для лечения синдрома сухого глаза, глазными терапевтическими системами или глазными линзами [14]. Глазная пленка Lacrisert® состоит из матрицы на основе гидроксипропилцеллюлозы. После введения в конъюнктивальный мешок пленка поглощает влагу из конъюнктивы и роговицы, образуя гидрофильный слой, который стабилизирует и утолщает слезную пленку и увлажняет роговицу. Действие препарата длится до 24 часов, а специальная блистерная упаковка позволяет производить стерильную пленку без добавления консервантов [40].

Коллагеновые экраны разработаны из свиной склеры, коллаген которой имеет высокое сходство с роговицей человека. Коллагеновые экраны хранятся в вакуумной упаковке и гидратируются перед введением в конъюнктивальную полость. Коллагеновые экраны могут быть носителями антибиотиков (гентамицин), противовоспалительных ЛС (дексаметазон) или противовирусных средств. По результатам исследований *in vivo* и клинических исследований по сравнению с глазными каплями использование коллагеновых экранов позволило получить более высокую концентрацию ЛС в роговице [13].

В последние годы все большее развитие получает использование *контактных линз* в качестве систем доставки лекарств [41–43]. В исследовании S. Gause et al. [41] с помощью математического моделирования была показана целесообразность использования контактных линз с АФИ и увеличение биодоступности на 50 % по сравнению с инстилляцией глазных капель. Разработаны контактные линзы с тимололом, дорзоламидом и витамином Е как отдельно, так и в комбинации [44]. В работе Д. К. Наплекова с соавторами [45] рассматриваются алгоритмы изготовления растворов АФИ для нагрузки контактных линз и использования их в качестве систем доставки на примере раствора гиалуроната натрия.

ГЛАЗНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ

Имплантаты представляют собой стерильную ЛФ, состоящую из полимерного матрикса с равномерно распределенным в нем АФИ, которое высвобождается в месте имплантации в течение заданного времени. Различают биодеградируемые и небиодеградируемые имплантаты. Продолжительность высвобождения АФИ из биодеградируемых имплантатов варьируется от 35 дней до 12 месяцев. Материалом для производства биодеградируемых имплантатов часто являются алифатические полиэфиры полигликолевой и полимолочной кислот и их сополимеров [46]. Небиодеградируемые имплантаты удаляются после окончания высвобождения АФИ для предотвращения их фиброзирования и инкапсулирования в полости глаза. В качестве основы матрикса таких имплантатов часто используются поливиниловый спирт, этивинилацетат, полибутилметакрилат, силикон и др. [46]. Имплантаты получают методом экструзии расплава или прямого прессования в матрицах различной формы. Как правило, глазные имплантаты покрывают оболочкой из полимерной основы, регулирующей высвобождение АФИ [46]. На базе исследовательского центра Макклая в Белфасте (Великобритания) разработан глазной интравитреальный имплантат OcuLief™ [42, 43], представляющий собой матрикс *in situ*, сшивка которого происходит после введения жидкого препара-

та в заднюю камеру глаза под действием направленного УФ-излучения.

OcuLief™ предназначен для лечения диабетической ретинопатии, возрастной макулярной дегенерации и диабетического макулярного отека путем длительного высвобождения антисосудистых эндотелиальных факторов роста или кортикостероидов в течение 4–6 месяцев и более [47].

ВИДЫ УПАКОВКИ ГЛАЗНЫХ ЛФ

Из-за высокой распространенности офтальмологических заболеваний, широкого применения глазных ЛФ, а также стоящей проблеме снижения микробной контаминации, точности дозирования и снижения процента ошибок при инстилляции, разработка инновационных видов упаковки глазных ЛФ особенно актуальна.

Для упаковки глазных капель традиционно используются флаконы-капельницы из стекла или полимерных материалов. Стеклянный флакон, снабженный стеклянной пипеткой-дозатором, широко использующийся в качестве фармацевтической упаковки капель в конце XX века, в настоящее время практически не применяется ввиду доказанной высокой степени вторичной контаминации через кончик стеклянного дозатора. Несмотря на преимущества стеклянной упаковки, себестоимость стеклянного флакона-капельницы существенно выше, чем аналогичной полимерной упаковки, полученной по ресурсосберегающей технологии BFS (Blow – Fill – Seal: выдув – наполнение – запайка). Многодозовые стеклянные и полимерные флаконы для глазных капель могут иметь различный объем, дизайн и конструкцию капельницы, контроль первого вскрытия, однако существенным недостатком такой упаковки будет потеря стерильности продукта после вскрытия и его вторичная контаминация. Также многодозовые капельницы не всегда могут обеспечить точность дозирования препарата пациентом. Малый срок хранения в открытом состоянии, а также многочисленные ошибки при инстилляции зачастую приводят к тому, что ЛФ в многодозовых флаконах не используется пациентом полностью и утилизируется.

Проблему потери стерильности препарата можно решить путем использования однодозовой упаковки, полученной из полимерных материалов по технологии BFS. Однако однодозовая упаковка глазных капель не решает в полной мере проблему точности дозирования препарата, так как из однодозовой капельницы невозможно извлечь 100 % продукции. Производителю приходится прибегать к перенаполнению упаковки, что ведет к увеличению себестоимости единицы продукции. Кроме того, по сравнению с многодозовым флаконом-капельницей однодозовые капельницы в упаковке занимают гораздо больший объем и менее удобны для хранения и транспортировки.

Порошки для приготовления глазных капель, как и другие стерильные твердые ЛФ, упаковывают в стеклянные флаконы, укупоренные резиновой пробкой и алюминиевым колпачком под обкатку. К использованию порошков прибегают в случае фармацевтической несовместимости компонентов или малой стабильности раствора при хранении.

Глазные пленки упаковывают в блистерную или контурно-ячеистую упаковку, внутри упаковки ЛФ, в зависимости от биоразлагаемости, находится под вакуумом или в изотоническом растворе. Для снижения риска микробной контаминации при введении глазной пленки в комплекте с первичной упаковкой прилагается аппликатор.

Тубы для глазных мягких ЛФ, как правило, имеют удлиненную насадку, позволяющую вводить препарат в конъюктивальную полость или в конъюктивальный мешок бесконтактным методом. Однако процент вторичной контаминации при использовании мягких ЛФ оценивается как высокий.

Очевидные недостатки однодозовой упаковки привели к необходимости модификации традиционных многодозовых флаконов-капельниц и защиты продукта от вторичной микробной контаминации. Были разработаны полимерные флаконы-капельницы, снабженные клапаном, контролирующим отсутствие обратного забора жидкости, насадкой с антибактериальными элементами (чаще используется обработка ионами серебра) и встроенным стерилизующим фильтром для воздуха (рисунок 1). При сдавливании полимерного флакона под давлением внутреннего воздуха происходит открытие клапана, доза ЛФ в виде капли проходит через насадку с антибактериальным покрытием и собирается на наконечнике. После окончания компрессии воздух проходит через стерилизующий фильтр и восполняет разность давлений вне и внутри упаковки. В настоящее время полимерные флаконы-капельницы такого типа производят многие компании, включая Aptarpharma (Швейцария), Nemera (Франция) и др. [43, 44]. Контроль за правильностью инстилляции, минимизирующий или исключающий потерю дозы, а также контроль соблюдения точности дозирования реализуется с помощью инновационных систем доставки жидких офтальмологических ЛФ (рисунок 2). Так, работа системы AcuStream® реализуется за счет специального устройства, распыляющего жидкую ЛФ на слизистую оболочку глазного яблока. Направленность факела распыления, дисперсность капельной фазы и точность дозирования обеспечивают высокую биодоступность ЛФ [50].

Компания Nemera предложила систему Novelia®, включающую полимерный флакон-капельницу Novelia®, снабженный клапаном с защитой от вторичной контаминации. Благодаря аппликатору-насадке, соответствующему анатомическому строению глазницы, минимизируется процент ошибочных инстилляций, а объем дозы и необходимое для его получения давление на инжекторе создается автоматически и управляется программой со смартфона [51].

Поиск оптимальных решений для введения жидких глазных ЛФ, обеспечения их качества на протяжении всего срока годности продолжается и по-прежнему является актуальной задачей.

Рисунок 1. Принцип работы и примеры многодозовых флаконов с использованием стерилизующей фильтрации [48–49]

Figure 1. Principle of operation and examples of multi-dose vials using sterilizing filtration [48–49]

Рисунок 2. Инновационные системы контроля дозирования глазных капель:

1 – система AcuStream® (Kedalion, США); 2 – мультидозовая офтальмологическая система (Aerpump, Германия); 3– мультидозовая система, управляемая со смартфона e-Novelia® (Nemera, Франция) [50–51]

Figure 2. Innovative control systems for dosing eye drops:

1 – AcuStream® system (Kedalion, USA); 2 – multi-dose ophthalmic system (Aerpump, Germany); 3 – multi-dose system controlled from a smartphone e-Novelia® (Nemera, France) [50–51]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время большая часть научных исследований по разработке офтальмологических систем доставки посвящена получению ЛФ, способных поддерживать постоянную концентрацию АФИ в ткани-мишени, обеспечивающих транспорт АФИ к ним. Это достигается использованием современных достижений в области нанотехнологий и химии полимеров. Получают жидкие и мягкие ЛФ с использованием липосом и наночастиц в качестве систем доставки, введением в состав различных пенетраторов. Активно разрабатываются и изучаются полимерные носители, такие как пленки, линзы и имплантаты. Развитие современных технологических подходов открывает новые возможности для терапии широкого круга офтальмологических заболеваний за счет снижения побочных эффектов, часто индуцируемых собственной токсичностью молекул ЛП, снижения частоты вводимой дозы и поддержания фармакологического профиля ЛП. Таким образом, использование современных офтальмологических систем доставки способно существенно ограничить применение инвазивных методов лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анурова М. Н., Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Кречетов С. П. Современные аспекты создания глазных лекарственных форм: определение реологических оптимумов офтальмологических гелей. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2017;21(4):64–70.
2. Королёва И. А., Оганезова Ж. Г. Терапия хронических заболеваний в офтальмологии: вопросы комплаентности. *РМЖ. Клиническая офтальмология.* 2016;16(1):59-63.
3. Wu Y., Liu Y., Li X., Kebebe D., Zhang B., Ren J., Lu J., Li J., Du S., Liu Zh. Research Progress of In-Situ Gelling Ophthalmic Drug Delivery System.*Asian J Pharm Sci.* 2019:14(1):1–15. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.04.008.
4. Esteban-Pérez S., Bravo-Osuna I., Andrés-Guerrero V., Molina-Martínez I. T., Herrero-Vanrell T. R. Microparticles Potential for Ophthalmic Drug Delivery. *Curr Med Chem.* 2020;27(4):570–582. DOI: 10.2174/0929867326666190905150331.
5. Perez-Cambrodi R. J., Pinero D. P., Mavrou A., Cervino A., Brautase R., Murube del Castillo J. Seals in the Roman Empire. *Acta Med Hist Adriat.* 2013;11(1):89–100.

6. King R. E. Dispensing of Medication, 9th ed. Mack Publishing Co.
7. Alcon. Available at: https://www.alcon.com/about-us#history. Accessed 28.06.2020.
8. Jani R., Gan O., Ali Y., Rodstrom R., Hancock S. Ion Exchange Resins for Ophthalmic Delivery. *J Ocul Pharmacol.* 1994;10(1):57–67. DOI: 10.1089/jop.1994.10.57.
9. Hosaka S., Ozawa H., Tanzawa H., Kinitomo T., Nichols R. L. Vivo Evaluation of Ocular Inserts of Hydrogel Impregnated with Antibiotics for Trachoma Therapy, Basic Research Laboratories and the Department of Microbiology. Harvard School of Public Health. *Medicine. Biomaterials*.1982. DOI:10.1016/0142-9612(83)90022-4.
10. Gressel P. D., Roehrs R. E. Ophthalmic carboxy vinyl polymer gel for dry eye syndrome. US Patent 5075104. 1991.
11. Sullivan L. J., Mc Currach F., Lee S., Taylor H. R., Rolando M., Marechal-Courtois C., Creuzot-Garcher C., Easty D. L., Karabatsas C., Bingh Hoh M., Faschinger C., Laroche L. Efficacy and Safety of 0.3 % Carbomer Gel Compared to Placebo in Patients With Moderate-To-Severe Dry Eye Syndrome. *Ophthalmology.* 1997;104(9):1402–1408. DOI: 10.1016/s0161-6420(97)30124-9.
12. Subrizi A., Del Amo E. M., Korzhikov-Vlakh V., Tennikova T., Ruponen M., Urtti A. Design principles of ocular systems: importance ofpayload, release rate, and material properties. *Drug Discov Today*. 2019;24(8):1446–1457. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.02.001.
13. Nayak K., Misra M. A Review on Recent Drug Delivery Systems for Posterior Segment of Eye. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:1564–1582. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.138.
14. Pahuja P., Arora S., Pawar P. Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(7):837–861.
15. Moosa R. M., Choonara Y. E., du Toit L. C., Kumar P., Carmichael T., Tomar L. K., Tyagi Ch., Pillay V. A Review of Topically Administered Mini-Tablets for Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(4):490–506. DOI: 10.1111/jphp.12131.
16. Mortazavi S. A., Jafariazar Z., Ghadjahani Y., Mahmoodi H., Mehtarpour F. Formulation and In-vitro Characterization of Sustained Release Matrix Type Ocular Timolol Maleate Mini-Tablet. *Iran J Pharm Res*. 2014;13(1):19–27.
17. Hylex®. Available at: https://www.brillpharma.com/hylex-spray-ocular/ Accessed 28.06.2020.
18. Moiseev R. V., Morrison P. W. J., Steele F., Khutoryanskiy V. V. Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):321. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070321.
19. Федорова П. Ю., Андресон Р. К., Алехин Е. К., Усанов Н. Г. Природные циклические олигосахариды – циклодекстрины, в системах доставки лекарств. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2011;6(4):125–131.
20. Loftsson Th., Stefánsson E. Cyclodextrins in Eye Drop Formulations: Enhanced Topical Delivery of Corticosteroids to the Eye. A*cta Ophthalmol Scand*. 2002;80(2):144–50. DOI: 10.1034/j.1600-0420.2002.800205.x.
21. Abdelkader H., Fathalla Z., Moharram H., Ali T. F. S., Pierscionek B. Cyclodextrin Enhances Corneal Tolerability and Reduces Ocular Toxicity Caused by Diclofenac Oxid. *Med Cell Longev*. 2018;13:5260976. DOI: 10.1155/2018/5260976.
22. Morrison P. W. J., Porfiryeva N. N., Chahal S., Salakhov I. A., Lacourt Ch., Semina I. I., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Crown Ethers: Novel Permeability Enhancers for Ocular Drug Delivery? *Mol. Pharm.* 2017;14(10):3528–3538. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00556.
23. Ibrahim M. M., Maria D. N., Mishra S. R., Guragain D., Wang X. D., Jablonski M. M. Once Daily Pregabalin Eye Drops for Management of Glaucoma. *ACS Nano.* 2019;13(12):13728–13744. DOI: 10.1021/acsnano.9b07214.
24. Dubald M. S. Bourgeois V. Andrieu. Ophthalmic Drug Delivery Systems for Antibiotherapy. *A Review. Pharmaceutics* 2018;10(1):10. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010010.
25. Honda M., Asai T., Oku N., Araki Y., Tanaka M., Ebihara N. Liposomes and Nanotechnology in Drug Development: Focus on Ocular Targets. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:495–503. DOI: 10.2147/IJN.S30725.
26. Ebrahim Sh., Peyman Gh. A., Lee P. J. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2005;50(2):167–82. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.12.006.
27. Kamaleddin M. A. Nano-ophthalmology: Applications and Considerations. *Nanomedicine.* 2017;13(4):1459–1472. DOI: 10.1016/j.nano.2017.02.007.
28. Tsai Ch. H., Wang P. Y., Lin I. Ch., Huang H., Liu Ch. H., Tseng Ch. L. Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2830. DOI: 10.3390/ijms19092830.
29. Obiedallah M. M., Abdel-Mageed A. M., Elfaham T. H. Ocular Administration of Acetazolamide Microsponges in Situ Gel Formulations. *Saudi Pharm J.* 2018;26(7):909–920. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.01.005.
30. Soliman K. A., Ullah K., Shah A., Jones D. V., Singh T. R. R. Poloxamer-based in Situ Gelling Thermoresponsive Systems for Ocular Drug Delivery Applications. *Drug Discov Today.* 2019;24(8):1575–1586. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.036.
31. Wang Q., Sun Ch., Xu B., Tu J., Shen J. Synthesis, Physicochemical Properties and Ocular Pharmacokinetics of Thermosensitive in Situ Hydrogels for Ganciclovir in Cytomegalovirus Retinitis. *Treatment Drug Deliv.* 2018;25(1):59–69. DOI: 10.1080/10717544.2017.1413448.
32. Singh R. B., Ichhpujani P., Thakur S., Jindal S. Promising thera peuticdrugdeliverysystemsfor glaucoma: a comprehensive review. *Ther Adv Ophthalmol.* 2020;12:2515841420905740. DOI: 10.1177/2515841420905740.
33. Palumbo F. S., Federico S., Pitarresi G., Fiorica C., Giammona G. Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydr Polym*. 2020. 1;229:115430. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115430.
34. Agibayeva L. E., Kaldybekov D. B., Porfiryeva N. N., Garipova V. R., Mangazbayeva R. A., Moustafine R. I., Semina I. I., Mun G. A., Kudaibergenov S. E., Khutoryanskiy V. V. Gellan gum and its methacrylated derivatives as *in situ* gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: *In vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Pharm*. 2020;577:119093. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119093.
35. Souto E. B., Dias-Ferreira J., López-Machado A., Ettcheto M., Cano A., Camins Espuny A., Espina M., Garcia M. L., Sánchez-López E. Advanced Formulation Approaches for Ocular Drug Delivery: State-Of-The-Art and Recent Patents. *Pharmaceutics*. 2019;11(9):460. DOI: 10.3390/pharmaceutics11090460.
36. Lynch C., Kondiah P. P. D., Choonara Y. E., du Toit L. C., Ally N., Pillay V. Advances in Biodegradable Nano-Sized Polymer-Based Ocular Drug Delivery. *Polymers*. 2019;11(8):1371. DOI: 10.3390/polym11081371.
37. Mazet R., Yaméogo J. B. G., Wouessidjewe D., Choisnard L., Gèze A. Recent Advances in the Design of Topical Ophthalmic Delivery Systems in the Treatment of Ocular Surface Inflammation and Their Biopharmaceutical Evaluation. *Pharmaceutics.* 2020;12(6):570–586. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060570.
38. Азнабаев М. Т., Азаматова Г. А., Гайсина Г. Я. Глазные лекарственные пленки в профилактике инфекционно-воспалительных осложнений. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2018;14(4):933–938.
39. Приказ Минздрава СССР от 13.10.1975 № 933 «О разрешении к медицинскому применению новых лекарственных средств».
40. McDonald M., D'Aversa G., Perry H. D., Wittpenn J. R., Nelinson D. J. Correlating Patient-Reported Response to Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Insert (LACRISERT®) Therapy With Clinical Outcomes: Tools for Predicting Response *Curr Eye Res*. 2010;35(10):880–887. DOI: 10.3109/02713683.2010.495811.
41. Gause S., Hsu K. H., Shafor Ch., Dixon Ph., Powell C. K., Chauhan A. Mechanistic Modeling of Ophthalmic Drug Delivery to the Anterior Chamber by Eye Drops and Contact Lenses Adv Colloid *Interface Sci.* 2016;233:139–154. DOI: 10.1016/j.cis.2015.08.002.
42. Alvarez-Lorenzo C., Anguiano-Igea S., Varela-García A., Vivero-Lopez M., Concheiro A. Bioinspired Hydrogels for Drug-Eluting Contact Lenses.*Acta Biomater.* 2019;15(84):49–62. DOI: 10.1016/j.actbio. 2018.11.020.
43. Maulvi F. A., Soni T. G., Shah D. O. A review on therapeutic contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(8):3017–3026. DOI: 10.3109/10717544.2016.1138342.

44. Cegielska O., Sajkiewicz P. Targeted Drug Delivery Systems for the Treatment of Glaucoma: Most Advanced Systems Review. *Polymers (Basel).* 2019;11(11):17–42. DOI: 10.3390/polym11111742.
45. Наплеков Д. К., Жилякова 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):59–64. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-59-64.
46. Vision in the future. Available at: https://www.revanatx.com. Accessed 29.06.2020.
47. Thakur R., Jones D. Biodegradable implants for sustained intraocular delivery of small and large molecules. *Ondrug Delivery.* 2018;82:28–31.
48. Birghoff M. Deliveryng of the growing need for topical preservative-free ophthalmic treatmens. *Ondrug Delivery.* 2020;104:8–13.
49. Davidson Z. Developing an efficient ophthalmic device combination product. *OndrugDelivery.* 2020;104:16–19.
50. Noymer P., Ivri I., Quintana R., Blumenkranz M. Acustream™: Bringing topical ophthalmic drugs delivery intro the modern era. *OndrugDelivery.* 2019;94:32–35.
51. Kraus R., Woesthuis W. Advanced drugs delivery for dry eye treatment. *Ondrug Delivery.* 2020;104:4–7.

REFERENCES

1. Anurova M. N., Bakhrushina E. O., Lapik I. V., Krechetov S. P. The Determination of the rheological optimum of ophthalmic gels. modern aspects of the ophthalmic dosage forms development. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;21(4):64–70. (In Russ.).
2. Koroleva I. A., Oganezova J. G. Treatment of chronic eye diseases: compliance issues. RMZH. *Klinicheskaya oftal'mologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology.* 2016;16(1):59-63. (In Russ.).
3. Wu Y., Liu Y., Li X., Kebebe D., Zhang B., Ren J., Lu J., Li J., Du S., Liu Zh. Research Progress of In-Situ Gelling Ophthalmic Drug Delivery System.*Asian J Pharm Sci.* 2019:14(1):1–15. DOI: 10.1016/j.ajps.2018.04.008.
4. Esteban-Pérez S., Bravo-Osuna I., Andrés-Guerrero V., Molina-Martínez I. T., Herrero-Vanrell T. R. Microparticles Potential for Ophthalmic Drug Delivery. *Curr Med Chem*. 2020;27(4):570–582. DOI: 10.2174/0929867326666190905150331.
5. Perez-Cambrodi R. J., Pinero D. P., Mavrou A., Cervino A., Brautase R., Murube del Castillo J. Seals in the Roman Empire. *Acta Med Hist Adriat*. 2013;11(1):89–100.
6. King R. E. Dispensing of Medication, 9th ed. Mack Publishing Co.
7. Alcon. Available at: https://www.alcon.com/about-us#history. Accessed 28.06.2020.
8. Jani R., Gan O., Ali Y., Rodstrom R., Hancock S. Ion Exchange Resins for Ophthalmic Delivery. *J Ocul Pharmacol.* 1994;10(1):57–67. DOI: 10.1089/jop.1994.10.57.
9. Hosaka S., Ozawa H., Tanzawa H., Kinitomo T., Nichols R. L. Vivo Evaluation of Ocular Inserts of Hydrogel Impregnated with Antibiotics for Trachoma Therapy, Basic Research Laboratories and the Department of Microbiology. Harvard School of Public Health. *Medicine. Biomaterials*.1982. DOI:10.1016/0142-9612(83)90022-4.
10. Gressel P. D., Roehrs R. E. Ophthalmic carboxy vinyl polymer gel for dry eye syndrome. US Patent 5075104. 1991.
11. Sullivan L. J., Mc Currach F., Lee S., Taylor H. R., Rolando M., Marechal-Courtois C., Creuzot-Garcher C., Easty D. L., Karabatsas C., Bingh Hoh M., Faschinger C., Laroche L. Efficacy and Safety of 0.3 % Carbomer Gel Compared to Placebo in Patients With Moderate-To-Severe Dry Eye Syndrome. *Ophthalmology.* 1997;104(9):1402–1408. DOI: 10.1016/s0161-6420(97)30124-9.
12. Subrizi A., Del Amo E. M., Korzhikov-Vlakh V., Tennikova T., Ruponen M., Urtti A. Design principles of ocular systems: importance ofpayload, release rate, and material properties. *Drug Discov Today.* 2019;24(8):1446–1457. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.02.001.
13. Nayak K., Misra M. A Review on Recent Drug Delivery Systems for Posterior Segment of Eye. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:1564–1582. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.138.
14. Pahuja P., Arora S., Pawar P. Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2012;9(7):837–861.
15. Moosa R. M., Choonara Y. E., du Toit L. C., Kumar P., Carmichael T., Tomar L. K., Tyagi Ch., Pillay V. A Review of Topically Administered Mini-Tablets for Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye. *J Pharm Pharmacol.* 2014;66(4):490–506. DOI: 10.1111/jphp.12131.
16. Mortazavi S. A., Jafariazar Z., Ghadjahani Y., Mahmoodi H., Mehtarpour F. Formulation and In-vitro Characterization of Sustained Release Matrix Type Ocular Timolol Maleate Mini-Tablet. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(1):19–27.
17. Hylex®. Available at: https://www.brillpharma.com/hylex-spray-ocular/ Accessed 28.06.2020.
18. Moiseev R. V., Morrison P. W. J., Steele F., Khutoryanskiy V. V. Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(7):321. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070321.
19. Fyodorova P. Yu., Andreson R. K., Alyekhin Ye. K., Usanov N. G. Natural cyclic oligosaccharides – cyclodextrins, in drug delivery systems. *Medicinskij vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal.* 2011;6(4):125–131. (In Russ.).
20. Loftsson Th., Stefánsson E. Cyclodextrins in Eye Drop Formulations: Enhanced Topical Delivery of Corticosteroids to the Eye. A*cta Ophthalmol Scand.* 2002;80(2):144–50. DOI: 10.1034/j.1600-0420.2002.800205.x.
21. Abdelkader H., Fathalla Z., Moharram H., Ali T. F. S., Pierscionek B. Cyclodextrin Enhances Corneal Tolerability and Reduces Ocular Toxicity Caused by Diclofenac Oxid. *Med Cell Longev.* 2018;13:5260976. DOI: 10.1155/2018/5260976.
22. Morrison P. W. J., Porfiryeva N. N., Chahal S., Salakhov I. A., Lacourt Ch., Semina I. I., Moustafine R. I., Khutoryanskiy V. V. Crown Ethers: Novel Permeability Enhancers for Ocular Drug Delivery? *Mol. Pharm.* 2017;14(10):3528–3538. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00556.
23. Ibrahim M. M., Maria D. N., Mishra S. R., Guragain D., Wang X. D., Jablonski M. M. Once Daily Pregabalin Eye Drops for Management of Glaucoma. *ACS Nano.* 2019;13(12):13728–13744. DOI: 10.1021/acsnano.9b07214.
24. Dubald M. S. Bourgeois V. Andrieu. Ophthalmic Drug Delivery Systems for Antibiotherapy. *A Review. Pharmaceutics* 2018;10(1):10. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010010.
25. Honda M., Asai T., Oku N., Araki Y., Tanaka M., Ebihara N. Liposomes and Nanotechnology in Drug Development: Focus on Ocular Targets. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:495–503. DOI: 10.2147/IJN.S30725.
26. Ebrahim Sh., Peyman Gh. A., Lee P. J. Applications of Liposomes in Ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2005;50(2):167–82. DOI: 10.1016/j.survophthal.2004.12.006.
27. Kamaleddin M. A. Nano-ophthalmology: Applications and Considerations. *Nanomedicine.* 2017;13(4):1459–1472. DOI: 10.1016/j.nano.2017.02.007.
28. Tsai Ch. H., Wang P. Y., Lin I. Ch., Huang H., Liu Ch. H., Tseng Ch. L. Ocular Drug Delivery: Role of Degradable Polymeric Nanocarriers for Ophthalmic Application. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2830. DOI: 10.3390/ijms19092830.
29. Obiedallah M. M., Abdel-Mageed A. M., Elfaham T. H. Ocular Administration of Acetazolamide Microsponges in Situ Gel Formulations. *Saudi Pharm J.* 2018;26(7):909–920. DOI: 10.1016/j.jsps.2018.01.005.
30. Soliman K. A., Ullah K., Shah A., Jones D. V., Singh T. R. R. Poloxamer-based in Situ Gelling Thermoresponsive Systems for Ocular Drug Delivery Applications. *Drug Discov Today.* 2019;24(8):1575–1586. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.05.036.
31. Wang Q., Sun Ch., Xu B., Tu J., Shen J. Synthesis, Physicochemical Properties and Ocular Pharmacokinetics of Thermosensitive in Situ Hydrogels for Ganciclovir in Cytomegalovirus Retinitis. *Treatment Drug Deliv.* 2018;25(1):59–69. DOI: 10.1080/10717544.2017.1413448.
32. Singh R. B., Ichhpujani P., Thakur S., Jindal S. Promising thera peuticdrugdeliverysystemsfor glaucoma: a comprehensive review. *Ther Adv Ophthalmol.* 2020;12:2515841420905740. DOI: 10.1177/2515841420905740.

33. Palumbo F. S., Federico S., Pitarresi G., Fiorica C., Giammona G. Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydr Polym*. 2020. 1;229:115430. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115430.
34. Agibayeva L. E., Kaldybekov D. B., Porfiryeva N. N., Garipova V. R., Mangazbayeva R. A., Moustafine R. I., Semina I. I., Mun G. A., Kudaibergenov S. E., Khutoryanskiy V. V. Gellan gum and its methacrylated derivatives as *in situ* gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: *In vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Pharm*. 2020;577:119093. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.119093.
35. Souto E. B., Dias-Ferreira J., López-Machado A., Ettcheto M., Cano A., Camins Espuny A., Espina M., Garcia M. L., Sánchez-López E. Advanced Formulation Approaches for Ocular Drug Delivery: State-Of-The-Art and Recent Patents. *Pharmaceutics*. 2019;11(9):460. DOI: 10.3390/pharmaceutics11090460.
36. Lynch C., Kondiah P. P. D., Choonara Y. E., du Toit L. C., Ally N., Pillay V. Advances in Biodegradable Nano-Sized Polymer-Based Ocular Drug Delivery. *Polymers*. 2019;11(8):1371. DOI: 10.3390/polym11081371.
37. Mazet R., Yaméogo J. B. G., Wouessidjewe D., Choisnard L., Gèze A. Recent Advances in the Design of Topical Ophthalmic Delivery Systems in the Treatment of Ocular Surface Inflammation and Their Biopharmaceutical Evaluation. *Pharmaceutics*. 2020;12(6):570–586. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060570.
38. Aznabaev M. T., Azamatova G. A., Gaysina G. Ya. Ophthalmic medicinal films in the prevention of infectious and inflammatory complications. *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2018;14(4):933–938. (In Russ.).
39. Order of the Ministry of Health of the USSR of 13.10.1975 No. 933 "On permission for the medical use of new drugs." (In Russ.).
40. McDonald M., D'Aversa G., Perry H. D., Wittpenn J. R., Nelinson D. J. Correlating Patient-Reported Response to Hydroxypropyl Cellulose Ophthalmic Insert (LACRISERT®) Therapy With Clinical Outcomes: Tools for Predicting Response *Curr Eye Res*. 2010;35(10):880–887. DOI: 10.3109/02713683.2010.495811.
41. Gause S., Hsu K. H., Shafor Ch., Dixon Ph., Powell C. K., Chauhan A. Mechanistic Modeling of Ophthalmic Drug Delivery to the Anterior Chamber by Eye Drops and Contact Lenses Adv Colloid *Interface Sci*. 2016;233:139–154. DOI: 10.1016/j.cis.2015.08.002.
42. Alvarez-Lorenzo C., Anguiano-Igea S., Varela-García A., Vivero-Lopez M., Concheiro A. Bioinspired Hydrogels for Drug-Eluting Contact Lenses.*Acta Biomater*. 2019;15(84):49–62. DOI: 10.1016/j.actbio. 2018.11.020.
43. Maulvi F. A., Soni T. G., Shah D. O. A review on therapeutic contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Deliv*. 2016;23(8):3017–3026. DOI: 10.3109/10717544.2016.1138342.
44. Cegielska O., Sajkiewicz P. Targeted Drug Delivery Systems for the Treatment of Glaucoma: Most Advanced Systems Review. *Polymers (Basel)*. 2019;11(11):17–42. DOI: 10.3390/polym11111742.
45. 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):59-64. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-59-64.
46. Vision in the future. Available at: https://www.revanatx.com. Accessed 29.06.2020.
47. Thakur R., Jones D. Biodegradable implants for sustained intraocular delivery of small and large molecules. *Ondrug Delivery*. 2018;82:28–31.
48. Birghoff M. Deliveryng of the growing need for topical preservative-free ophthalmic treatmens. *Ondrug Delivery*. 2020;104:8–13.
49. Davidson Z. Developing an efficient ophthalmic device combination product. *OndrugDelivery*. 2020;104:16–19.
50. Noymer P., Ivri I., Quintana R., Blumenkranz M. Acustream™: Bringing topical ophthalmic drugs delivery intro the modern era. *OndrugDelivery*. 2019;94:32–35.
51. Kraus R., Woesthuis W. Advanced drugs delivery for dry eye treatment. *Ondrug Delivery*. 2020;104:4–7.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-67-73
УДК 615.015.14; 615.015.16

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Влияние растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства субстанций дарунавира и дарунавира этанолата

С. А. Золотов[1], И. А. Даин[1], Н. Б. Демина[2], А. С. Золотова[1], Е. С. Пономарев[1]*

1 – ООО «АМЕДАРТ», 109316, Россия, г. Москва, Волгоградский проспект, д. 42, корп. 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:** Пономарев Евгений Сергеевич. **E-mail:** eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: С. А. Золотов – https://orcid.org/0000-0002-1852-7615; И. А. Даин – https://orcid.org/0000-0002-8101-0758; Н. Б. Демина – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; А. С. Золотова – https://orcid.org/0000-0003-2854-1653; Е. С. Пономарев – https://orcid.org/0000-0003-2538-5544.

Статья поступила: 11.12.2020. **Статья принята в печать:** 20.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Использование агрессивных технологических условий при получении лекарственной формы (растворителей, высокой температуры и др.) могут привести к изменению свойств фармацевтической субстанции. Дарунавир (Д) аморфный и дарунавира этанолат (ДЭ) кристаллический обладают плохой растворимостью, чувствительностью к высоким температурам, способностью к псевдополиморфизму.

Цель. Изучение влияния растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства субстанций Д и ДЭ.

Материалы и методы. Д (Mylan Laboratories Limited), ДЭ (Mylan Laboratories Limited), Д (стандартный образец) 99,9 % (MSN Pharmachem Private Limited). Навеску Д или ДЭ суспендировали на магнитной мешалке в одном из растворителей и сушили в сушильном шкафу. Рентгеновскую порошковую дифрактометрию высушенных образцов проводили с использованием автоматического порошкового дифрактометра. Методом ДСК изучали термические свойства образцов. Кристаллические образцы исследовались с помощью ИК-спектроскопии. Подлинность ДЭ и Д определяли методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. В статье приведены результаты изучения влияния различных растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства Д и ДЭ. Методами рентгеновской порошковой дифрактометрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии и ВЭЖХ изучено влияние растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства субстанций. Показано, что в зависимости от вида растворителя и температуры сушки в продукте могут присутствовать как кристаллические сольваты Д, так и аморфный Д.

Заключение. Для получения лекарственного препарата, содержащего в качестве фармацевтической субстанции аморфный несольватированный Д, отличающийся более высокой растворимостью, возможно использование растворителей: дихлорметана, хлороформа или гептана. В этом случае сушку полупродукта следует проводить при температуре ниже температуры кипения растворителя. При использовании этанола, метанола, ацетона, тетрагидрофурана (ТГФ) сушка должна быть осуществлена при температуре выше температуры плавления получаемых псевдополиморфов. Если для получения лекарственного препарата используется субстанция ДЭ, для ее обработки целесообразно использование только спирта этилового, температура сушки продукта не должна превышать 73,4 °С.

Ключевые слова: дарунавир, дарунавира этанолат, сольваты, псевдополиморфизм, технология твердых лекарственных форм, рентгеновская порошковая дифрактометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Авторы С. А. Золотов, И. А. Даин и Н. Б. Демина придумали и разработали эксперимент. Авторы Е. С. Пономарев и И. А. Даин синтезировали образцы и провели их исследование с помощью рентгеновской порошковой дифрактометрии. Автор А. С. Золотова провела исследования методом ДСК. С. А. Золотов провел исследование методом ИК-спектроскопии. И. А. Даин и С. А. Золотов провели исследования методом ВЭЖХ. Авторы Е. С. Пономарев и С. А. Золотов участвовали в обработке данных. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Золотов С. А., Даин И. А., Демина Н. Б., Золотова А. С., Пономарев Е. С. Влияние растворителей и температуры сушки на физико-химические свойства субстанций дарунавира и дарунавира этанолата. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):67–73. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-67-73

The Effect of Solvents and Drying Temperature on the Physicochemical Properties of Darunavir and Darunavir Ethanolate Substances

Sergey A. Zolotov[1], Igor A. Dain[1], Natalia B. Demina[2], Anna S. Zolotova[1], Evgeny S. Ponomarev[1]*

1 – LLC "AMEDART", 42/24, Volgogradsky av., Moscow, 109316, 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:** Evgeny S. Ponomarev. **E-mail:** eugene.s.ponomarev@gmail.com

ORCID: Sergey A. Zolotov – https://orcid.org/0000-0002-1852-7615; Igor A. Dain – https://orcid.org/0000-0002-8101-0758; Natalia B. Demina – https://orcid.org/0000-0003-4307-8791; Anna S. Zolotova – https://orcid.org/0000-0003-2854-1653; Evgeny S. Ponomarev – https://orcid.org/0000-0003-2538-5544.

Received: 11.12.2020. **Revised:** 20.01.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Usage of aggressive conditions (solvents, high temperature, etc.) in a dosage form manufacturing can lead to a change in the properties of a pharmaceutical substance. Darunavir (D) amorphous and darunavir ethanolate (DE) crystalline both have poor solubility, ability to pseudopolymorphism and are sensitive to high temperatures.

© Золотов С. А., Даин И. А., Демина Н. Б., Золотова А. С., Пономарев Е. С., 2021
© Zolotov S. A., Dain I. A., Demina N. B., Zolotova A. S., Ponomarev E. S., 2021

Aim. Study the effect of solvents and drying temperature on the physicochemical properties of D and DE substances
Materials and methods. D (Mylan Laboratories Limited), DE (Mylan Laboratories Limited), D (reference standard) 99,9 % (MSN Pharmachem Private Limited). D and DE weighed quantity was suspended in one of the solvents via magnetic stirrer and was dried via universal oven. Powder X-ray diffraction of dried samples was carried out via automatic powder diffractometer. Using DSC thermal properties of the samples were studied. Crystalline samples were examined using IR spectroscopy. Identification of D and DE was performed by HPLC method.
Results and discussion. This article summarizes study results of the investigation of various solvents and drying temperature influence on the physicochemical properties of D and DE are presented. The impact of solvent type and drying temperatures in physicochemical properties of the APIs was studied by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry, IR spectroscopy and HPLC methods. It was shown, that solvent type and drying temperatures can result in the presence of crystalline D solvates or amorphous D.
Conclusion. To obtain the final drug containing as an API amorphous D, which perform better dissolution, one of the enlisted solvents can be used: dichloromethane, chloroform and heptane. In such case the intermediate product drying should be performed at not exceeding the solvent boiling point temperatures. In case of ethanol, methanol, acetone and tetrahydrofuran drying phase can be performed at temperatures, that are higher than melting points of obtained pseudopolymorphs. For the utilization of DE as an API only ethanol usage is efficient and drying temperature should not exceed 73.4 °C.

Keywords: darunavir, darunavir ethanolate, solvates, pseudopolymorphism, solid dosage form technology, X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry, IR spectroscopy, HPLC.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Sergey A. Zolotov, Igor A. Dain and Natalia B. Demina – conceptualization, methodology. Evgeny S. Ponomarev and Igor A. Dain – samples preparation and X-ray diffraction investigation. Anna S. Zolotova – DSC investigation. Sergey A. Zolotov – IR spectroscopy investigation. Igor A. Dain и Sergey A. Zolotov – HPLC investigation. Evgeny S. Ponomarev and Sergey A. Zolotov – data analysis. All authors – results evaluation and writing of the article: review and editing.

For citation: Zolotov S. A., Dain I. A., Demina N. B., Zolotova A. S., Ponomarev E. S. The effect of solvents and drying temperature on the physicochemical properties of darunavir and darunavir ethanolate substances. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(1):67–73. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-67-73

ВВЕДЕНИЕ

При производстве лекарственных форм зачастую используются высокотемпературные технологические процессы, способные повлиять на физико-химические свойства субстанции: гранулирование, сушка, экструзия и другие. Ингибитор ВИЧ-протеазы дарунавир (Д) применяется в терапии ВИЧ в форме аморфной субстанции или кристаллического дарунавира этанолата (ДЭ) в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой. Температура разложения молекулы ДЭ – 78 °C [1], что практически исключает ее высокотемпературную технологическую переработку (выше температуры плавления) в процессе получения лекарственных форм [2], так как при разложении ДЭ испаряется этанол и образуется Д, отличающийся по своим физико-химическим свойствам от ДЭ. Поэтому на предварительных этапах фармацевтической разработки лекарственного препарата необходимо изучение влияния условий технологических процессов переработки фармацевтической субстанции на ее физико-химические свойства.

Субстанция ДЭ относится ко 2-му классу биофармацевтической классификационной системы (БКС) [3], то есть обладает плохой растворимостью. Аморфный Д обладает лучшей растворимостью [1], это свидетельствует в пользу его перспективности, так как увеличение растворимости субстанции может положительно повлиять на ее биодоступность [4].

В научных публикациях отсутствуют сведения о полиморфных модификациях Д, но известны его псевдополиморфы – гидраты и спиртовые сольваты (на основе этанола, пропиленгликоля) и другие [5]. *Псевдополиморфизм* – это явление образования молекулярных комплексов (гидратов для воды и сольватов в общем случае), содержащих в кристаллической решетке как молекулы вещества, так и молекулы растворителя. В свою очередь, известно, что сольваты фармацевтических субстанций и их несольватированные формы обладают различной растворимостью, скоростью растворения и биодоступностью [6].

Использование легко летучих растворителей при получении лекарственного препарата возможно как на этапе синтеза и очистки субстанции, так и при нанесении покрытий или при создании полупродуктов, получаемых с целью повышения растворимости и биодоступности, таких как твердые дисперсии, со-кристаллы и др. Замещение сольватированного растворителя (например, этанола) в молекуле субстанции представляет существенный риск для готовой продукции, так как новая форма субстанции (новый сольват) не исследована как оригинальная субстанция, которая прошла химические и биологические тесты, требуемые регуляторной системой при регистрации лекарственных средств. Таким образом, в ходе разработки технологии эффективного инновационного лекарственного препарата представляет интерес изучение влияния растворителей, применяемых в фармацевтической технологии, на физико-химические свойства Д и ДЭ.

Целью работы является изучение влияния различных органических растворителей, применяемых как в процессе очистки и выделения активной фармацевтической субстанции, так и в технологии ле-

карственных форм, и температуры сушки раствора или суспензии Д и ДЭ на физико-химические свойства субстанций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- Дарунавира этанолат, Mylan Laboratories Limited, Индия, серия № 22128670.
- Дарунавир, Mylan Laboratories Limited, Индия, серия № 3342845.
- Дарунавир (стандартный образец), содержание дарунавира 99,9 %, MSN Pharmachem Private Limited, Индия, серия № DIWS1701.

Растворители: гептан, для ВЭЖХ (Baker, США) ($T_{кипения}$ 98,4 °C); дихлорметан, для ВЭЖХ (Fluka, США) ($T_{кипения}$ 40,0 °C); хлороформ, для ВЭЖХ (Macron, США) ($T_{кипения}$ 61,2 °C); этилацетат, для ВЭЖХ (Baker, США) ($T_{кипения}$ 77,0 °C); метанол, для ВЭЖХ (Baker, США) ($T_{кипения}$ 64,7 °C); этанол, для ВЭЖХ (Merck, Германия) ($T_{кипения}$ 78,4 °C); ацетон, для ВЭЖХ (Panreac, США) ($T_{кипения}$ 56,1 °C); тетрагидрофуран, для ВЭЖХ (Panreac, США) ($T_{кипения}$ 66,0 °C).

Подготовка образцов. Навеску Д или ДЭ суспендировали на магнитной мешалке при скорости вращения 100 об/мин в течение 1 часа в одном из растворителей, указанных выше, и сушили в сушильном шкафу UN30 (Memmert, Германия) при полном открытии форсунки в двух режимах:

- в течение 24 часов при температуре на 5 °C ниже температуры кипения растворителя;
- в течение 24 часов при температуре на 5 °C выше температуры плавления получаемых псевдополиморфов.

Рентгеновскую порошковую дифрактометрию высушенных образцов проводили с использованием автоматического порошкового дифрактометра Ultima IV (Rigaku, Япония) в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0011.15 [7].

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе Q20P (TA Instruments, США) изучали термические свойства образцов. Измерения проводили в атмосфере воздуха при скорости нагрева 10 °C/мин. Температура нагревания – до 160 °C.

Методом инфракрасной (ИК) спектроскопии изучали полученные кристаллические структуры. Регистрацию ИК-спектров проводили путем прижатия исследуемого образца прижимным устройством к кристаллу нарушения полного внутреннего отражения (НПВО), обеспечивая максимальный контакт поверхности образца с кристаллом.

Съемку спектров ИК проводили на программно-аппаратном комплексе на основе ИК-Фурье-спектрометра Vertex 70 (Bruker, США) с использованием приставки НПВО (кристалл ZnSe) при следующих условиях: разрешение – 4 $см^{-1}$; количество сканов фона/образца – 16.

Спектр фона регистрировался непосредственно перед каждым измерением. Регистрация и обработка полученных спектров проводилась в программном обеспечении OPUS (ver. 7.0), Bruker, США.

Подлинность ДЭ и Д определяли методом ВЭЖХ согласно [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения образцов методом рентгеновской порошковой дифрактометрии

На рисунке 1 представлены дифрактограммы образцов, полученных при внесении несольватированного Д в различные растворители и сушке в течение 24 часов при температуре на 5 °C ниже температуры кипения растворителя. В таблице 1 указаны основные рефлексы дифрактограмм.

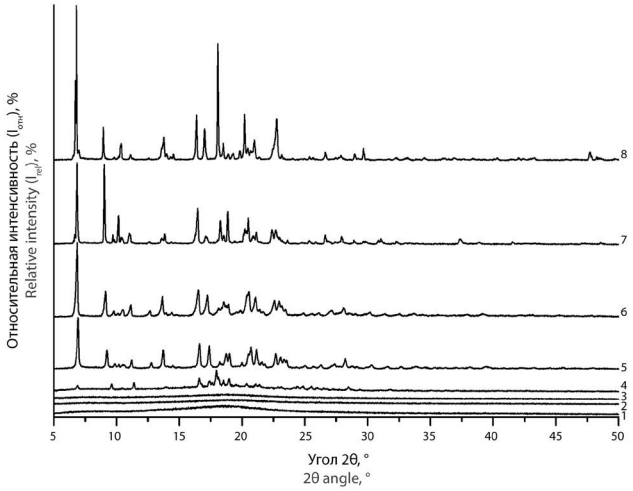


Рисунок 1. Дифрактограммы образцов дарунавира, суспендированных в растворителях и высушенных при температуре на 5 °C ниже температуры кипения растворителя:

1 – гептан; 2 – дихлорметан; 3 – хлороформ; 4 – этилацетат; 5 – метанол; 6 – этанол; 7 – ацетон; 8 – тетрагидрофуран

Figure 1. Diffraction patterns of darunavir samples, suspended in solvents and dried at 5 °C less than solvent boiling point:

1 – heptane; 2 – dichloromethane; 3 – chloroform; 4 – ethyl acetate; 5 – methanol; 6 – ethanol; 7 – acetone; 8 – tetrahydrofuran

Рисунок 1 показывает: образование кристаллических сольватов наблюдается в случае растворителей, в молекуле которых присутствуют гидрофильные связи С—О (спирты: метанол, этанол; сложные эфиры: этилацетат; циклические эфиры: ТГФ) или С=О (кетоны: ацетон). Твердые препараты, полученные из гептана, дихлорметана и хлороформа остаются рентгеноаморфными, как и исходный Д. Кроме того, вид дифрактограмм (положение и мультиплетность линий, соотношение интенсивностей) позволяет предположить изоструктурность сольватов Д с метанолом, этанолом, ацетоном и ТГФ, в то время как сольват с этилацетатом обладает другой структурой.

Таблица 1. Основные рефлексы дифрактограмм (рисунок 1)

Table 1. Main reflexes of the diffraction patterns (figure 1)

4		5		6		7		8	
2θ,°	$I_{отн.}$, % $I_{rel.}$, %	2θ,°	$I_{отн.}$, % $I_{rel.}$, %	2θ,°	$I_{отн.}$, % $I_{rel.}$, %	2θ,°	$I_{отн.}$, % $I_{rel.}$, %	2θ,°	$I_{отн.}$, % $I_{rel.}$, %
6,91	36	6,94	100	6,82	100	6,81	100	6,71	52
9,36	43	9,22	38	9,14	39	9,02	98	6,81	100
11,41	48	13,71	39	13,65	34	10,15	36	8,95	22
16,58	66	16,61	51	16,52	43	16,46	46	13,76	16
17,38	53	17,38	47	17,23	36	18,25	30	16,37	30
17,98	100	18,73	33	18,56	26	18,07	38	17,01	21
18,53	58	18,99	33	20,54	42	20,23	21	18,07	75
18,93	63	20,69	44	21,08	33	20,49	34	20,19	30
25,53	33	21,15	41	22,57	28	22,38	20	20,99	13
28,5	31	23,06	25	22,95	27	22,66	20	22,77	27

Дифрактограммы образцов Д и ДЭ после обработки указанными растворителями с последующей сушкой на 5 °С выше температуры плавления полученных псевдополиморфов были идентичными. Все полученные образцы демонстрируют аморфное состояние. Так, на рисунке 2 представлено аморфное гало образца ДЭ, суспендированного в этилацетате и высушенного в течение 24 часов при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа.

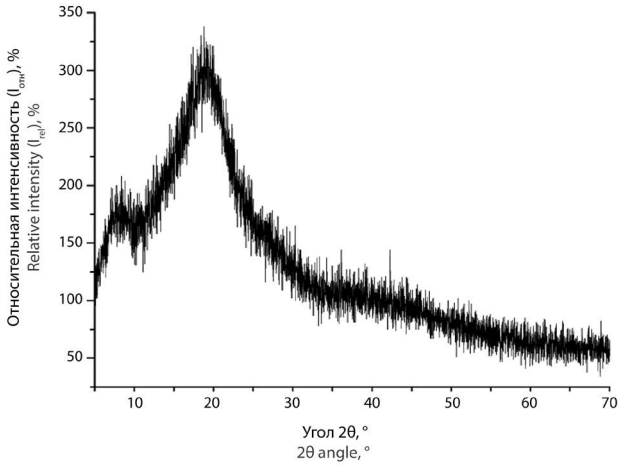


Рисунок 2. Аморфное гало на дифрактограмме образца дарунавира этанолата, высушенного при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа

Figure 2. Amorphous halo at the diffraction pattern of darunavir ethanolate sample, dried at 5 °C above than resultant pseudopolymorph melting point

Результаты изучения образцов методом ДСК

ДСК образцов, полученных с использованием таких растворителей, как ацетон, этилацетат, ТГФ, метанол, и высушенных при температуре на 5 °С ниже температуры кипения растворителя в течение 24 часов, не отличались для Д или ДЭ, демонстрировали термограмму с минимумом, отличным для каждого растворителя. Для ацетона этот минимум находился в интервале от 81 до 84 °С, для метанола – от 82 до 85 °С, для этилацетата – от 103 до 105 °С, для ТГФ – от 97 до 99 °С. На рисунке 3 приведены кривые ДСК для образца Д, обработанного различными растворителями и высушенного при температуре на 5 °С ниже температуры кипения растворителя. Для сравнения на рисунке 3 также приведена термограмма субстанции ДЭ.

ДСК образцов рентгеноаморфного дарунавира, полученных после обработки субстанций Д или ДЭ растворителями: дихлорметаном, хлороформом, геп-

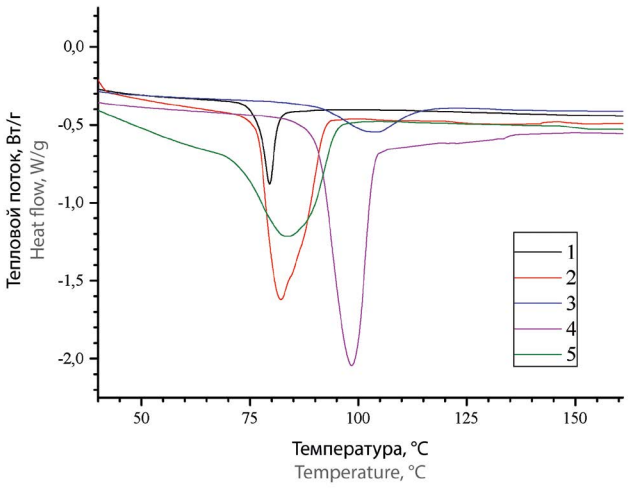


Рисунок 3. Термограмма ДСК субстанции дарунавир этанолат и образцов дарунавира, высушенных при температуре на 5 °С ниже температуры кипения растворителя:

1 – дарунавир этанолат; 2 – ацетон, 3 – этилацетат, 4 – тетрагидрофуран, 5 – метанол

Figure 3. DSC thermogram of darunavir ethanolate substance and darunavir samples, dried at 5 °C less than solvent boiling point:

1 – darunavir ethanolate; 2 – acetone, 3 – ethyl acetate, 4 – tetrahydrofuran, 5 – methanol

таном – с последующей сушкой при температуре на 5 °С ниже температуры кипения растворителя не отличались, имели идентичную термограмму без минимума. Пример такой термограммы приведен на рисунке 4.

Термограммы ДСК образцов рентгеноаморфного дарунавира, полученных после обработки субстанций Д или ДЭ каждым из исследуемых растворителей и высушенных в течение 24 часов при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемых псевдополиморфов, не отличались, имели идентичный характер без минимума. Это видно из данных рисунка 4, на котором в качестве примера приведена термограмма образца, полученного в результате обработки ДЭ ацетоном с последующей сушкой в течение 24 часов при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа.

Результаты изучения образцов методом ИК

Далее приведены ИК-спектры образца, полученного в результате суспендирования ДЭ в этилацетате с последующей сушкой при температуре на 5 °С ниже температуры кипения этилацетата (рисунок 5), и исходного ДЭ (рисунок 6). Так, наличие на рисунке 5 полосы поглощения 3374 см$^{-1}$ свидетельствует о наличии сольвата, отличного по структуре от исходного ДЭ.

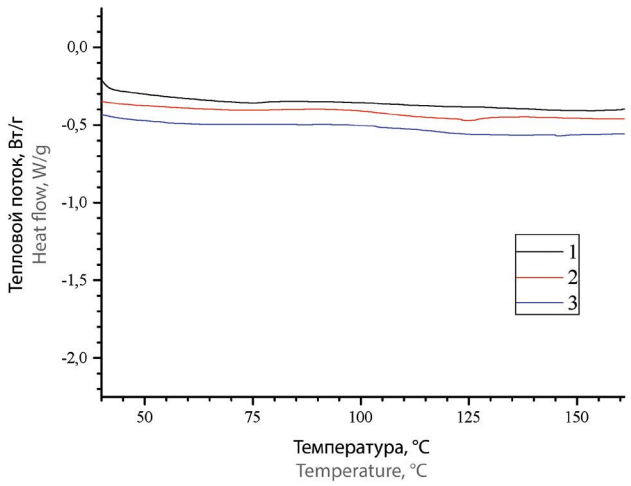


Рисунок 4. Термограмма ДСК субстанции дарунавир (1) и образцов дарунавира этанолата, высушенных в течение 24 часов при температуре на 5 °С ниже температуры кипения хлороформа (2) и при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа (3)

Figure 4. DSC thermogram of darunavir substance (1) and darunavir ethanolate sample, dried for 24 hours at 5 °C less than chloroform boiling point (2) and at 5 °C above than resultant pseudopolymorph boiling point (3)

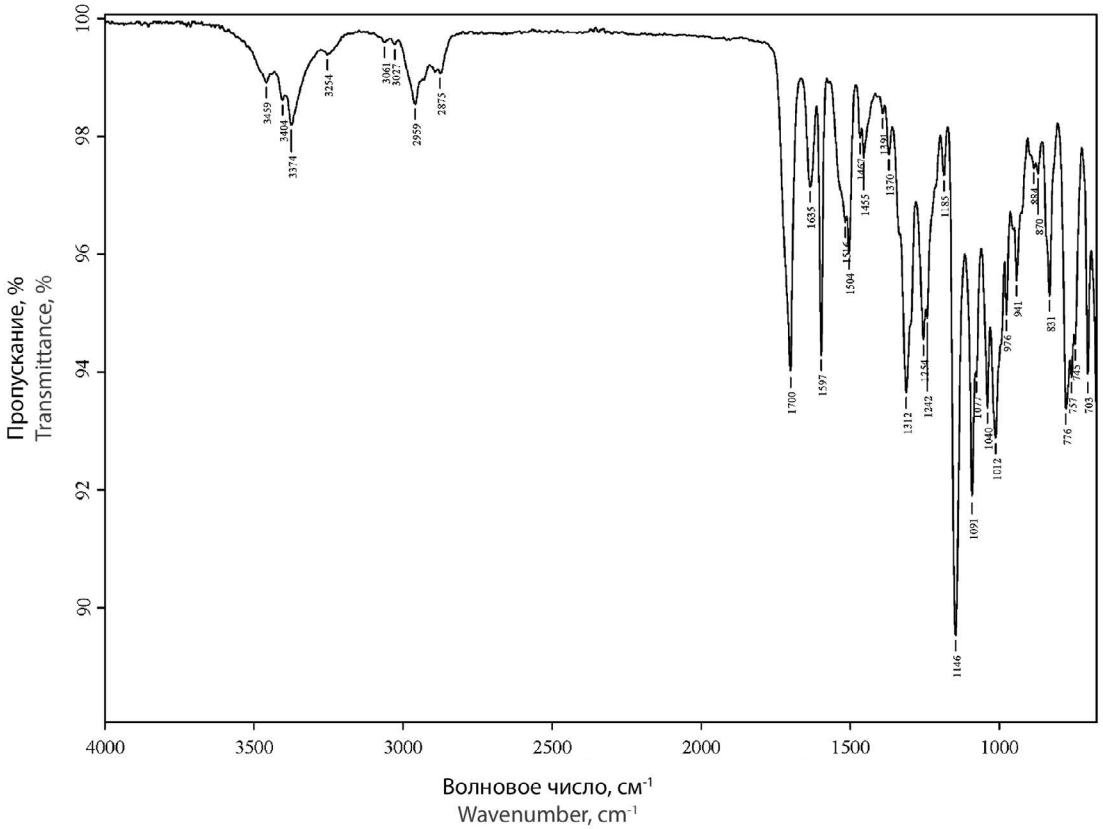


Рисунок 5. ИК-спектр образца дарунавира этанолата, высушенного в течение 24 часов при температуре на 5 °С ниже температуры кипения этилацетата

Figure 5. IR spectrum of darunavir ethanolate sample, dried for 24 hours at 5 °C less than ethyl acetate boiling point

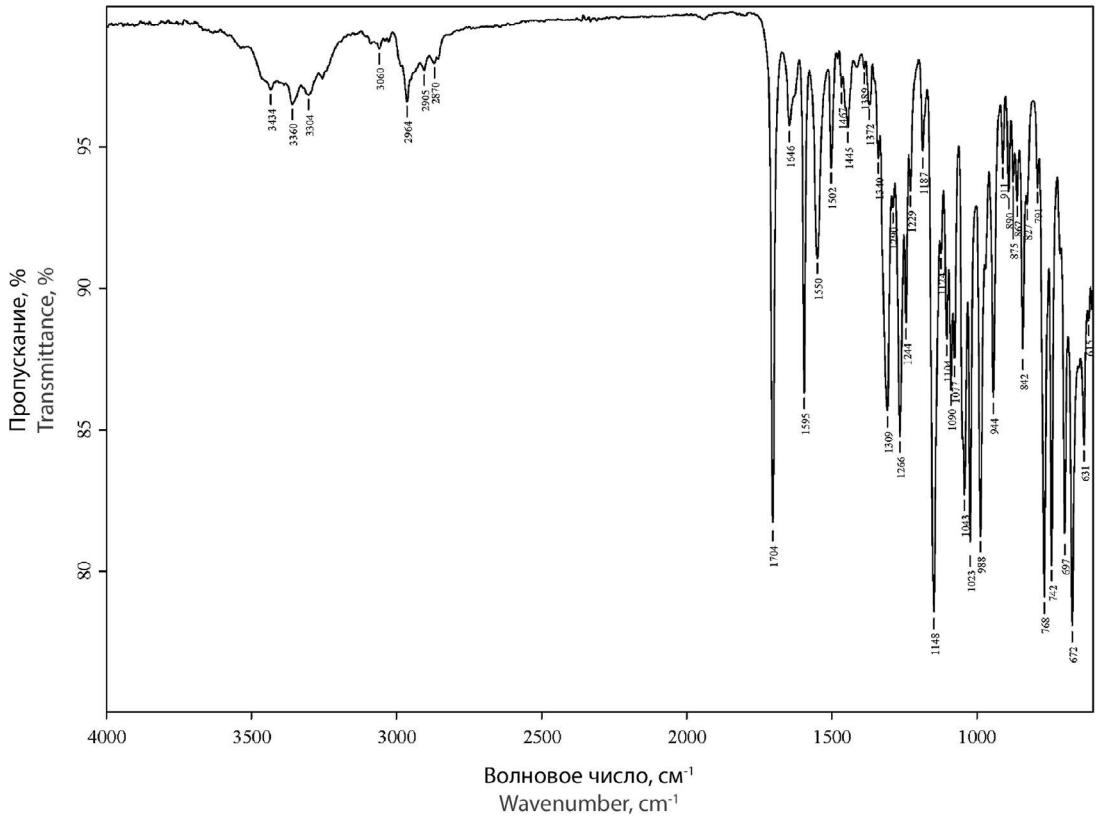


Рисунок 6. **ИК-спектр дарунавира этанолата**

Figure 6. **IR spectrum darunavir ethanolate**

Результаты изучения образцов методом ВЭЖХ

На рисунке 7 приведена хроматограмма образца, полученного в результате суспендирования ДЭ в этилацетате с последующей сушкой в течение 24 часов при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа. На рисунке 8 изображена хроматограмма стандартного образца (СО) Д.

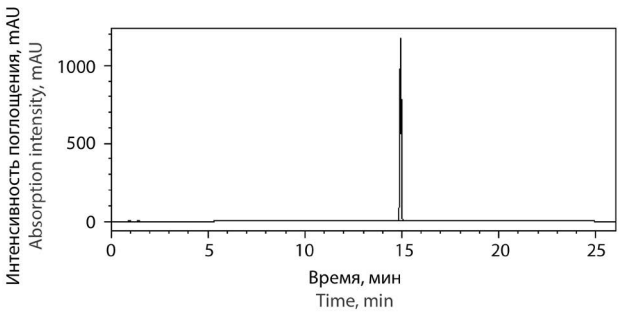


Рисунок 7. **Хроматограмма образца дарунавира этанолата, высушенного в течение 24 часов при температуре на 5 °С выше температуры плавления получаемого псевдополиморфа**

Figure 7. **Chromatogram of darunavir ethanolate sample, dried for 24 hours at 5 °C above than resultant pseudopolymorph melting point**

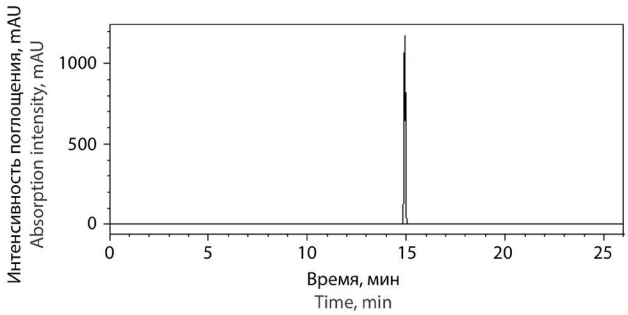


Рисунок 8. **Хроматограмма СО дарунавира**

Figure 8. **Chromatogram of darunavir RS**

Время выхода пиков составило 14,9 минут, на рисунке 7 и на рисунке 8 они эквивалентны. Хроматограммы всех испытуемых образцов, полученных в результате эксперимента, показали время выхода, эквивалентное времени выхода СО Д, оно составило 14,9 + 2 % RSD; типичная хроматограмма образца представлена на рисунке 7.

В результате проведенного эксперимента показано, что кристаллические структуры Д и ДЭ образуются после обработки субстанций этанолом, метанолом, ацетоном, ТГФ и этилацетатом с последующей сушкой ниже температуры кипения растворителя. Причем об-

разцы, обработанные ацетоном и метанолом, имеют эндотермический минимум в интервале температур от 81 до 85 °С, близкий температуре плавления Д. На основании этого можно предположить, что в результате такой технологической обработки происходит разрушение ближнего порядка структуры молекулы и в дальнейшем, возможно, происходит высвобождение растворителя.

В результате обработки субстанций Д и ДЭ растворителями, такими как дихлорметан, хлороформ, гептан, и сушки полученных суспензий ниже температуры кипения растворителя образуются твердые частицы, не обладающие кристаллической структурой без выраженной энергии между собой, что подтверждается кривыми ДСК, которые не имеют минимумов. Такие же структуры получены после обработки Д и ДЭ всеми используемыми в работе растворителями после сушки при температуре выше температуры плавления получаемых псевдополиморфов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что для получения лекарственного препарата, содержащего в качестве фармацевтической субстанции аморфный несольватированный Д, отличающийся более высокой растворимостью, возможно использование таких растворителей, как дихлорметан, хлороформ или гептан. В этом случае сушку полупродукта следует проводить при температуре ниже температуры кипения растворителя. При использовании этанола, метанола, ацетона, ТГФ сушка должна быть осуществлена при температуре выше температуры плавления получаемых псевдополиморфов.

Если для получения лекарственного препарата используется субстанция ДЭ, для ее обработки целесообразно использование только спирта этилового, температура сушки продукта не должна превышать 73,4 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотов С. А, Демина Н. Б., Золотова А. С. Изучение физико-химических свойств субстанции дарунавира этанолата. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;22(6):30–35. DOI: 10.29296/25877313-2019-06-05.
2. Thakkar R., Thakkar R., Pillai A., Ashour E. A., Repka M. A. Systematic screening of pharmaceutical polymers for hot melt extrusion processing: a comprehensive review. *International journal of pharmaceutics*. 2020;576:118989. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118989.
3. Ruela Correa J. C., D'Arcy D. M., dos Reis Serra C. H., Nunes Salgado H. R. Darunavir: A Critical Review of Its Properties, Use and Drug Interactions. *Pharmacology*. 2012;19:102–109. DOI: 10.1159/000339862.
4. Dahan A., Miller J. M., Amidon, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*. 2009;11(4):740–746. DOI: 10.1208/s12248-009-9144-x.
5. Гойзман М. С., Зотова О. А., Камалова А. А., Попова А. О., Шоболов Д. Л., Корлюков А. А., Супоницкий К. Ю. Шимоновский Н. Л. Зайцев С. А. Дегтерев Е. В. К вопросу о патентовании дарунавира и его аналогов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(6):45–51. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-6-45-51.
6. ОФС.1.1.0017.15. Полиморфизм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/
7. ОФС.1.2.1.1.0011.15. Рентгеновская порошковая дифрактометрия. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. URL: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/
8. Reddy B. V., Jyothi G., Reddy B. S., Raman N. V., Reddy K. S., Rambabu C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(5):471–476. DOI: 10.1093/chromsci/bms165.

REFERENCES

1. Zolotov S. A, Demina N. B., Zolotova A. S. Study of darunavir ethanolate physicochemical properties. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2019;22(6):30–35. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2019-06-05.
2. Thakkar R., Thakkar R., Pillai A., Ashour E. A., Repka M. A. Systematic screening of pharmaceutical polymers for hot melt extrusion processing: a comprehensive review. *International journal of pharmaceutics*. 2020;576:118989. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118989.
3. Ruela Correa J. C., D'Arcy D. M., dos Reis Serra C. H., Nunes Salgado H. R. Darunavir: A Critical Review of Its Properties, Use and Drug Interactions. *Pharmacology*. 2012;19:102–109. DOI: 10.1159/000339862.
4. Dahan A., Miller J. M., Amidon, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*. 2009;11(4):740–746. DOI: 10.1208/s12248-009-9144-x.
5. Goizman M. S., Zotova O. A., Kamalova A. A., Popova A. O., Shobolov D. L., Korlyukov A. A., Suponitskii K. Y., Shimanovskii N. L., Zaitsev S. A., Degterev E. V. Issues related to patent protecton of darunavir and its analogs. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2016;50(6):45–51. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-6-45-51.
6. *Obshchaya farmakopeynaya stat'ya 1.1.0017.15. Polimorfizm* [General monograph 1.1.0017.15 Polymorphism]. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. Moscow, 2018. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/ (In Russ.).
7. *Obshchaya farmakopeynaya stat'ya 1.2.1.1.0011.15. Rentgenovskaya poroshkovaya difraktometriya* [General monograph 1.2.1.1.0011.15. X-ray powder diffraction]. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. Moscow, 2018. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/ (In Russ.).
8. Reddy B. V., Jyothi G., Reddy B. S., Raman N. V., Reddy K. S., Rambabu C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(5):471–476. DOI: 10.1093/chromsci/bms165.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-74-81
УДК 54.062; 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Разработка параметров стандартизации сырья ряски малой (*Lemna minor* L.)

Л. Н. Никифоров[1], С. В. Кривощеков[1]*, Н. Э. Коломиец[1], Т. В. Кадырова[1], Н. В. Исайкина[1], Н. Ю. Абрамец[1], Е. А. Безверхняя[1,2], М. В. Белоусов[1,2]

1 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России), 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2
2 – ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ФГАОУ ВО НИ ТПУ), 634050, Россия, г. Томск, проспект Ленина, д. 30

***Контактное лицо:** Кривощеков Сергей Владимирович. **E-mail:** ksv_tsu@mail.ru

ORCID: Л. Н. Никифоров – https://orcid.org/0000-0003-1016-5856; С. В. Кривощеков – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Н. Э. Коломиец – https://orcid.org/0000-0003-0520-921X; Т. В. Кадырова – https://orcid.org/0000-0002-2119-0259; Н. В. Исайкина – https://orcid.org/0000-0001-6440-8636; Н. Ю. Абрамец – https://orcid.org/0000-0002-6017-2133; Е. А. Безверхняя – https://orcid.org/0000-0001-7699-5719; М. В. Белоусов – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Статья поступила: 19.11.2020. **Статья принята в печать:** 22.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Ряска малая (*Lemna minor* L.) – вид подсемейства рясковые (*Lemnaceae* S. F. Gray), широко распространенный в водоемах России. Данные литературы подтверждают возможность заготовки значительных объемов этого сырья как дикорастущего, так и выращиваемого в условиях аквакультуры. Исследуемый вид характеризуется накоплением в процессе биосинтеза различных групп веществ с широким спектром биологической активности. Это обуславливает перспективу использования сырья ряски малой для разработки лекарственных средств и парафармацевтических продуктов, а изучение данного сырья, его стандартизация, определение требований к подлинности, качеству и безопасности являются актуальной задачей.

Цель. Установление макро- и микроскопических признаков сырья и разработка методик количественного определения основных групп биологически активных веществ (БАВ) для стандартизации сырья ряски малой.

Материалы и методы. Трава ряски малой (*Lemna minor* L.) была заготовлена в естественных местах обитания на территории Западной Сибири. В работе использованы макро-, микроскопические методы исследования, методы ВЭЖХ, УФ-спектрометрии.

Результаты и обсуждение. При изучении внешних (макроскопических) и микроскопических признаков установлены характерные диагностические признаки ряски малой, которые могут быть использованы для подтверждения подлинности сырья. Для оценки качества сырья разработана и валидирована методика количественного определения суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Заключение. Изучение внешних (макроскопических) и микроскопических признаков позволило определить характерные диагностические признаки, позволяющие достоверно определять подлинность ряски малой. Разработана методика количественного определения полисахаридов гравиметрическим методом – прямым методом измерения количества вещества. Методика количественного определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту валидирована по показателям линейности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и правильности. Установлены значения показателей для критериев «подлинность» и «количественное определение», которые могут быть использованы в проекте НД на лекарственное растительное сырье «Ряски трава».

Ключевые слова: *Lemna minor* L., трава ряски малой, микроскопические признаки, стандартизация, фенолкарбоновые кислоты, хлорогеновая кислота, полисахариды.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Л. Н. Никифоров, С. В. Кривощеков, М. В. Белоусов разработали эксперимент. С. В. Кривощеков, Т .В. Кадырова, Е. А. Безверхняя провели валидацию методики количественного определения фенолкарбоновых кислот. Н. Э. Коломиец, Н. В. Исайкина, Н. Ю. Абрамец проводили заготовку сырья ряски малой, выполнили исследование внешних (макроскопических), микроскопических признаков. Все авторы участвовали в обсуждении статьи, внесли вклад в окончательную рукопись.

Для цитирования: Никифоров Л. Н., Кривощеков С. В., Коломиец Н. Э., Кадырова Т. В., Исайкина Н. В., Абрамец Н. Ю., Безверхняя Е. А., Белоусов М. В. Разработка параметров стандартизации сырья ряски малой (*Lemna minor* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):74–81. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-74-81

Development of Parameters for Standardization of Duckweed (*Lemna Minor* L.) Raw Material

Leonid N. Nikiforov[1], Sergei V. Krivoshchekov[1]*, Natalia E. Kolomiets[1], Tatyana V. Kadyrova[1], Nadezhda V. Isaikina[1], Natalia Y. Abramets[1], Ekaterina A. Bezverkhniaia[1,2], Mikhail V. Belousov[1,2]

1 – Siberian State Medical University (SSMU), 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia
2 – National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin av., Tomsk, 634050, Russia

***Corresponding author:** Sergei V. Krivoshchekov. **E-mail:** ksv_tsu@mail.ru

ORCID: Leonid N. Nikiforov – https://orcid.org/0000-0003-1016-5856; Sergei V. Krivoshchekov – https://orcid.org/0000-0001-5505-7141; Natalia E. Kolomiets – https://orcid.org/0000-0003-0520-921X; Tatyana V. Kadyrova – https://orcid.org/0000-0002-2119-0259; Nadezhda V. Isaikina – https://orcid.org/0000-0001-6440-8636; Natalia Y. Abramets – https://orcid.org/0000-0002-6017-2133; Ekaterina A. Bezverkhniaia – https://orcid.org/0000-0001-7699-5719; Mikhail V. Belousov – https://orcid.org/0000-0002-2153-7945.

Received: 19.11.2020. **Revised:** 22.01.2021. **Published:** 25.02.2021

© Никифоров Л. Н., Кривощеков С. В., Коломиец Н. Э., Кадырова Т. В., Исайкина Н. В., Абрамец Н. Ю., Безверхняя Е. А., Белоусов М. В., 2021
© Nikiforov L. N., Krivoshchekov S. V., Kolomiets N. E., Kadyrova T. V., Isaikina N. V., Abramets N. Y., Bezverkhniaia E. A., Belousov M. V., 2021

Abstract

Introduction. *Lemna minor* L. (duckweed) refers to the duckweed subfamily (*Lemnaceae* S. F. Gray) and widely distributed in ponds of Russia. Literature data confirm the possibility of harvesting significant volumes of this raw material in natural habitat and grown in aquaculture. The process of biosynthetic accumulation in duckweed fronds provides a variety of compounds with a wide spectrum of biological activity. Therefore, the use of raw materials *Lemna minor* L. is promising for the development of drugs and parapharmaceutical products. Thus, it is an urgent task to quantify active components of duckweed and standardize (determination of criteria for identification, quality and safety) plant material.

Aim. Establish macro- and microscopic characteristics of raw materials and develop methods for the quantitative determination of the main groups of biologically active substances (BAS) for standardization of raw duckweed.

Materials and methods. Samples of duckweed was collected in natural habitats of Western Siberia. Macro- and microscopic assay, HPLC, UV-spectrometry were used in research process.

Results and discussion. Were established the criteria for identification of duckweed fronds by studying external (macroscopic) and microscopic features of raw material *Lemna minor* L. Was developed and validated the procedure of the quantitative determination of phenolcarboxylic acids in raw material *Lemna minor* L.

Conclusion. The study of external (macroscopic) and microscopic features provided the criteria for identification of the raw material *Lemna minor* L. The technique for the quantitative analysis of polysaccharides using gravimetry does not need validation, because is a direct method of substance measurement. Was validated quantification method of phenolcarboxylic acids (in terms of chlorogenic acid) by criteria of linearity, repeatability, in-laboratory precision and accuracy. Was established quality criteria for identification and quantitative assay, which can be used in the draft for normative documents for medicinal plant raw material of *Lemna minor* L. «Duckweed fronds».

Keywords: *Lemna minor* L., duckweed fronds, microscopic features, standardization, phenolcarboxylic acids, chlorogenic acid, polysaccharides.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Leonid N. Nikiforov, Sergei V. Krivoshchekov, Mikhail V. Belousov developed the design of experiments. Sergei V. Krivoshchekov, Tatyana V. Kadyrova, Ekaterina A. Bezverkhniaia validated the method of quantative analysis. Natalia E. Kolomiets, Nadezhda V. Isaikina, Natalia Y. Abramets collected raw materials of *Lemna minor* L., performed a study of external (macroscopic), microscopic features. All authors participated in the discussion of the article, contributed to the final manuscript.

For citation: Nikiforov L. N., Krivoshchekov S. V., Kolomiets N. E., Kadyrova T. V., Isaikina N. V., Abramets N. Y., Bezverkhniaia E. A., Belousov M. V. Development of parameters for standardization of duckweed (*Lemna minor* L.) raw material. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* = *Drug development & registration*. 2021;10(1):74–81. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-74-81

ВВЕДЕНИЕ

Подсемейство рясковые (*Lemnaceae* S. F. Gray) относится к водным однодольным цветковым растениям. В водоемах России широко представлены три вида подсемейства: многокоренник обыкновенный, или ряска многокорневая (*Spirodella polyrrhiza*), ряска малая (*Lemna minor*) и ряска тройчатая (*Lemna trisulca*) [1]. Данные литературы подтверждают возможность заготовки значительных объемов сырья как дикорастущего, так и выращиваемого в условиях аквакультуры, и прежде всего ряски малой [2, 3].

В настоящее время практическое применение нашла в основном ряска малая (*Lemna minor*), из которой производят гомеопатические препараты, БАДы для лечения витилиго, веганский протеиновый порошок. В России несколько производителей на основе *Lemna minor* выпускают чайные напитки с заявляемой нутрицевтической ценностью.

Анализ крупнейших международных баз цитирования показывает большой интерес отечественных и зарубежных ученых разных отраслей наук к видам подсемейства рясковые. Несмотря на это, до сих пор по отдельным представителям подсемейства, а также отдельным группам БАВ информация носит фрагментарный характер. Наиболее изученными группами БАВ в ряске малой являются аминокислоты, белки, жирные кислоты, по отдельным видам фрагментарно изучены полисахариды, элементный состав, фенольные соединения [4–7]. Согласно данным литературы преобладающей группой фенольных соединений в сырье *Lemna minor* L. являются фенолкарбоновые кислоты [8].

Спектр подтвержденной экспериментальной активности рясковых включает антимикробное, противовоспалительное, гастропротективное, желчегонное, антимутагенное, антиоксидантное, антирадикальное, антикоагулянтное, антиадипогенезное, криопротекторное и противоопухолевое действие, адсорбирующую активность [9–13]. Поэтому различные виды ряcок могут быть использованы для разработки лекарственных средств, парафармацевтических продуктов, что должно сопровождаться разработкой нормативной документации, в которой определены требования к подлинности, качеству и безопасности.

Цель исследования заключалась в установлении макро- и микроскопических признаков и разработке методик количественного определения основных групп БАВ для стандартизации сырья ряски малой и контроля его качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили образцы дикорастущего сырья ряски малой (*Lemna minor* L.), заготовленные в естественных местах их произрастания на территории Томской, Новосибирской и Кемеровс-

кой областей в течение вегетационного периода в 2020 г. Образцы сырья высушены воздушно-теневым способом.

Внешние признаки листецов и корней рассматривали невооруженным глазом, под лупой (2х; 10х) и в стереомикроскоп (8х; 16х; 32х) в соответствии с ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» ГФ РФ.

Микроскопический анализ сырья проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ. Анализировали не менее десяти препаратов под микроскопом МИКМЕД (АО «ЛОМО», Россия) (увеличения 7х1,5х8; 7х1,5х20; 7х1,5х40; 15х1,5х8; 15х1,5х20; 15х1,5х40). Препараты фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата Canon EOS 500D. Снимки, представленные на рисунках, обрабатывали на компьютере в программе Adobe Photoshop CS.

Для количественного определения фенолкарбоновых кислот получали спиртовое извлечение. Для этого навеску сырья массой 10 г помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 мл, приливают 200 мл 70 % этилового спирта и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут с обратным холодильником. После извлечение фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» в мерную колбу вместимостью 250 мл, промывая трижды шрот на фильтре 70 % этиловым спиртом порциями по 5 мл. После чего доводят объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 4 мл полученного раствора помещают в делительную воронку и добавляют 20 мл гексана, интенсивно взбалтывают несколько раз. После расслоения отбирают 2 мл нижнего слоя в пробирку и удаляют растворитель в токе азота. Сухой остаток растворяют в 2 мл 70 % этилового спирта.

Стандартный раствор хлорогеновой кислоты готовили из навески 0,1000 г (точная навеска) рабочего стандартного образца хлорогеновой кислоты, которую помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл 70 % этилового спирта и перемешивали до полного растворения. После чего доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 0,8 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем.

Количественное определение хлорогеновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом. Исследование проводили на приборе СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия).

Количественное определение полисахаридов при стандартизации растительного сырья предложено проводить гравиметрически после осаждения полисахаридного комплекса ряски 96 % спиртом этиловым.

Навеску массой около 10,0 г (точная навеска) растительного сырья помещают в колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл воды очищенной, нагревают на кипящей водяной бане и экстрагируют в течение 1 часа. После извлечение фильтруют через тканевый фильтр и экстракцию повторяют ещё 1 раз. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» под вакуумом. Фильтрат упаривают на роторном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляют трехкратный объем 96 % этилового спирта и выдерживают в течение 12 часов в холодильнике для полного осаждения полисахаридного комплекса. Затем осадок отфильтровывают через предварительно доведенный до постоянной массы бумажный фильтр, осадок на фильтре промывают горячим 96 % этиловым спиртом, затем ацетоном. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы и взвешивают.

Поскольку гравиметрический метод количественного определения полисахаридов в растительном сырье является прямым методом измерения количества вещества и ГФ РФ не требует подтверждения соответствия получаемых результатов требованиям к методикам, применяемым в фармацевтическом анализе, валидацию методики не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Высушенное сырье представляет собой смесь цельных или частично измельченных непрозрачных листецов, одиночных или образующих группы из 2–4 экземпляров (рисунок 1). Корни одиночные волосовидные, от бледно-зеленого до темно-коричневого цвета, длиной 11–18 мм (рисунок 1, Б). Листецы с верхней стороны слегка выпуклые, зеленого, светло-зеленого цвета, с нижней стороны плоские, зеленого цвета (рисунок 1, А). Листецы обратнояйцевидные или эллиптические, реже округлые (2–3 мм длиной, 1–2,5 мм шириной), цельнокрайние, с тупой верхушкой и округло-клиновидным, реже округлым основанием; на листьях при рассматривании их в стереомикроскоп хорошо заметна аэренхи-

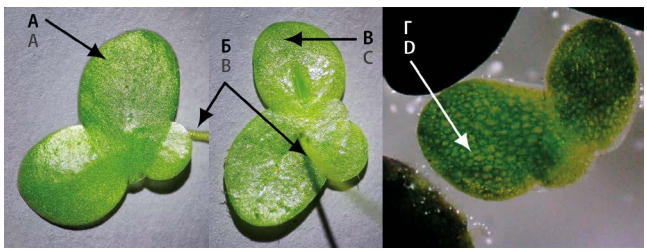


Рисунок 1. ***Lemna minor*** **L.**

А – листец верхняя сторона; Б – одиночные корни; В – листец, нижняя сторона; Г – аэренхима с воздухоносными полостями на нижней стороне

Figure 1. ***Lemna minor*** **L.**

A – upper side of a frond; B – single roots; C – lower side of a frond; D – aerenchyma with air cavities on the lower side

ма с воздухоносными полостями (рисунок 1, Г). Запах слабый, характерный. Вкус водного извлечения солоновато-горький.

При рассмотрении листецов с поверхности видно, что клетки верхнего эпидермиса разнонаправленные, слабоизвилистые, многоугольные (рисунок 2), клетки эпидермиса нижней стороны листа имеют устьица, слабоизвилистые и сильноизвилистые, продольно вытянутые стенки (рисунок 3). Между верхним и нижним слоем клеток эпидермиса хорошо заметна развитая аэренхима, которая занимает до 2/3 объема листеца, межклетники округло-эллиптические, их диаметр в 6–12 раз больше диаметра клеток аэренхимы и в 5–6 раз больше диаметра клеток верхнего эпидермиса (рисунок 4, А). На листецах хорошо заметны клетки-идиобласты с рафидами (рисунок 4, Б). Основание листецов переходит в корни (рисунок 5, А), клетки которых прямостенные, вытянутые по длине (рисунок 5, Б).

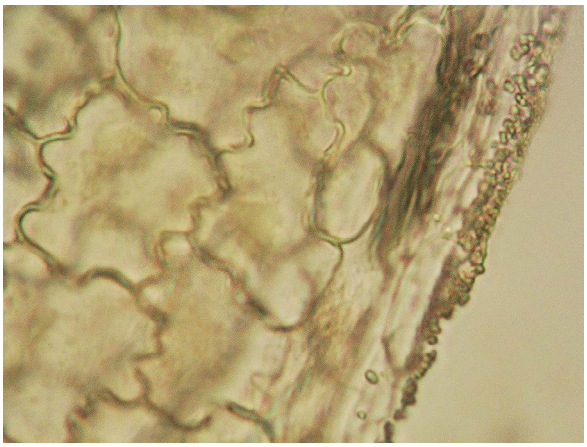


Рисунок 2. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor* L. Верхний эпидермис

Figure 2. Planar preparation of *Lemna minor* L. frond. Upper epidermis

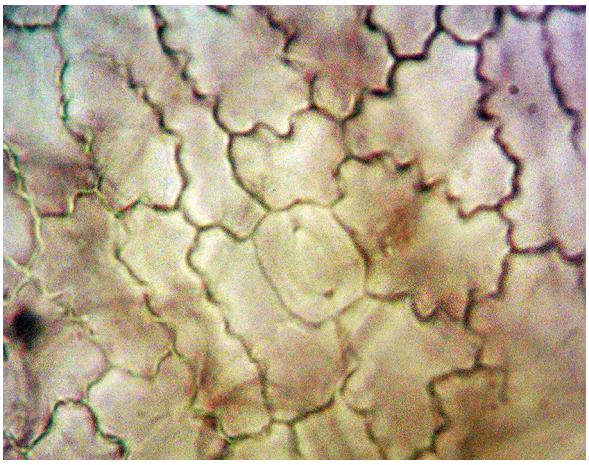


Рисунок 3. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor* L. Устьица на нижнем эпидермисе

Figure 3. Planar preparation of *Lemna minor* L. frond. Stomatal distribution on lower epidermis

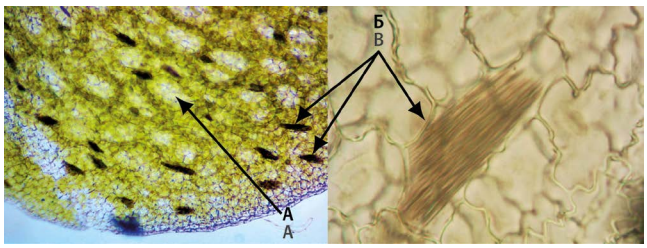


Рисунок 4. Плоскостной препарат листеца *Lemna minor* L.
А – аэренхима; Б – рафиды

Figure 4. Planar preparation of *Lemna minor* L. frond.
A – aerenchyma; B – raphides

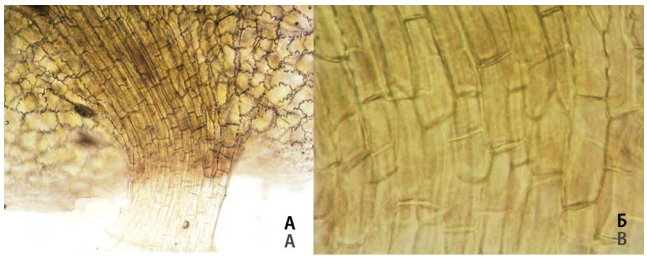


Рисунок 5. Плоскостной препарат *Lemna minor* L.
А – основание листеца с корнем; Б – прямостенные клетки эпидермиса корня

Figure 5. Planar preparation of *Lemna minor* L.
A – the base of a rooted frond; B – straight-walled cells of the root epidermis

Определение фенолкарбоновых кислот

Как уже было отмечено, преобладающей группой фенольных соединений в сырье являются фенолкарбоновые кислоты, для количественного определения которых предлагается использовать распространенную методику прямой спектрофотометрии [14], успешно применяемую для стандартизации ряда растительных объектов, но с модификацией прободготовки.

Результаты исследования (таблица 1) содержания фенолокислот в извлечениях, полученных с помощью 70 % этилового спирта и этилацетата, показывают, что использование этилового спирта приводит к более исчерпывающему извлечению аналитов из растительного сырья – более чем в 2 раза. В 70 % этанольном извлечении установлено методом ВЭЖХ [8] наличие следующих фенолкарбоновых кислот: хлорогеновой, 3,5-дигидроксибензойной, кофеиновой, ванильной, 2,3-дигидроксибензойной, *м*-кумаровой, *о*-кумаровой, бензойной и коричной кислот.

Таким образом, предложено в качестве экстрагента методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в ряске малой использовать 70 % этиловый спирт.

Таблица 1. **Содержание фенолкарбоновых кислот в извлечениях из сырья *Lemna minor* L.**

Table 1. **The content of phenolcarboxylic acids in extracts from *Lemna minor* L. raw material**

Наименование исследуемого образца / The name of the test sample	Количественное содержание по данным ВЭЖХ, % в пересчете на массу экстрактивных веществ / Quantitative content according to HPLC data, % based on the mass of extractives												
	Хлорогеновая кислота / Chlorogenic acid	3,5-дигидроксибензойная кислота / 3,5-dihydroxybenzoic acid	Кофеиновая кислота / Caffeic acid	Ванильная кислота / Vanillic acid	2,5-дигидроксибензойная кислота / 2,5-dihydroxybenzoic acid	2,6-дигидроксибензойная кислота / 2,6-dihydroxybenzoic acid	2,3-дигидроксибензойная кислота / 2,3-dihydroxybenzoic acid	Хинная кислота / Quinic acid	Феруловая кислота / Ferulic acid	*м*-кумаровая кислота / *m*-coumaric acid	*о*-кумаровая кислота / *o*-coumaric acid	Бензойная кислота / Benzoic acid	Коричная кислота / Cinnamic acid
EtAc	0,17	0,13	0,08	0,03	–	0,17	0,06	–	0,07	0,04	0,02	–	0,006
70 % EtOH	0,27	0,13	0,03	0,03	–	–	0,008	–	–	0,0009	0,005	0,02	0,002

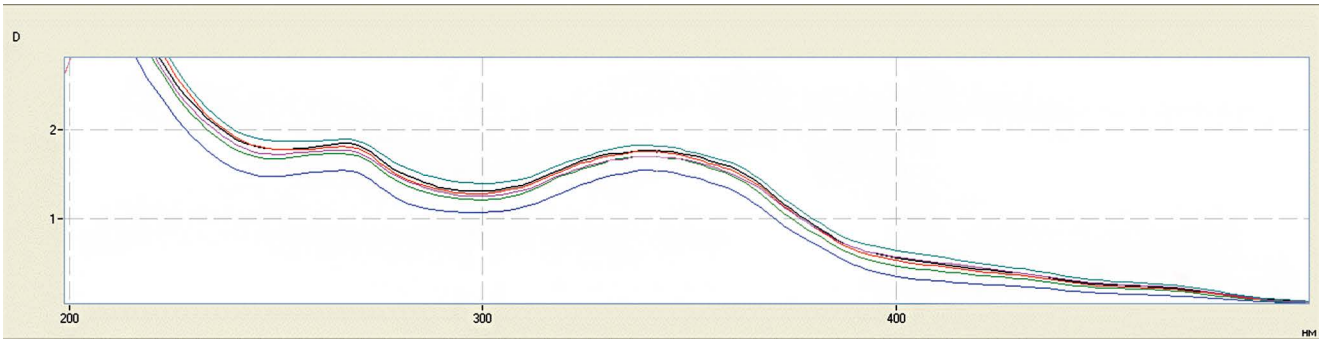


Рисунок 6. **УФ-спектры этанольных извлечений из *Lemna minor* L. (20, 30, 40, 50 минут экстракции)**

Figure 6. **UV-spectra of ethanolic extracts from *Lemna minor* L. (20, 30, 40, 50 minutes extraction)**

Определение рабочего времени экстракции (рисунок 6) показало, что при 30 и более минутах экстракции не наблюдается достоверного увеличения оптической плотности.

Однако большой вклад в поглощение вносят липофильные вещества, не относящиеся к фенолкарбоновым кислотам, поэтому в пробоподготовку внесена стадия жидкость-жидкостной экстракции гексаном в соотношении 1:5 (рисунок 7).

С учетом полученного спектра экстракта из сырья в качестве стандарта предложено использовать хлорогеновую кислоту (λ_{MAX} = 327 нм). В разработанных условиях подготовки проб определены основные валидационные характеристики методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски. Уровни содержания целевой группы веществ при валидации варьировали изменением массы навески экстрагируемого сырья. Линейность методики показана в диапазоне концентраций хлорогеновой кислоты от 0,1 до 10 мкг/мл с коэффициентом корреляции (R) 0,9999 (рисунок 8).

Для исследуемого диапазона определили показатели сходимости результатов – повторяемость и внутрилабораторная прецизионность (таблицы 2–3) и правильность (таблица 4).

С помощью предложенных методик проанализированы образцы сырья ряски малой, заготовленные в различных областях произрастания (таблица 5).

Таблица 2. **Оценка повторяемости методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту**

Table 2. **Evaluation of the repeatability of the procedure for the determination of phenolcarboxylic acids in terms of chlorogenic acid**

Уровень / Level	W, %	Среднее / Average	Δ	RSD, %
80	0,309	0,317	0,008	2,25
	0,319			
	0,310			
	0,323			
	0,315			
	0,327			
100	0,310	0,313	0,005	1,51
	0,309			
	0,318			
	0,313			
	0,318			
	0,308			
120	0,324	0,321	0,004	1,00
	0,320			
	0,319			
	0,317			
	0,320			
	0,326			

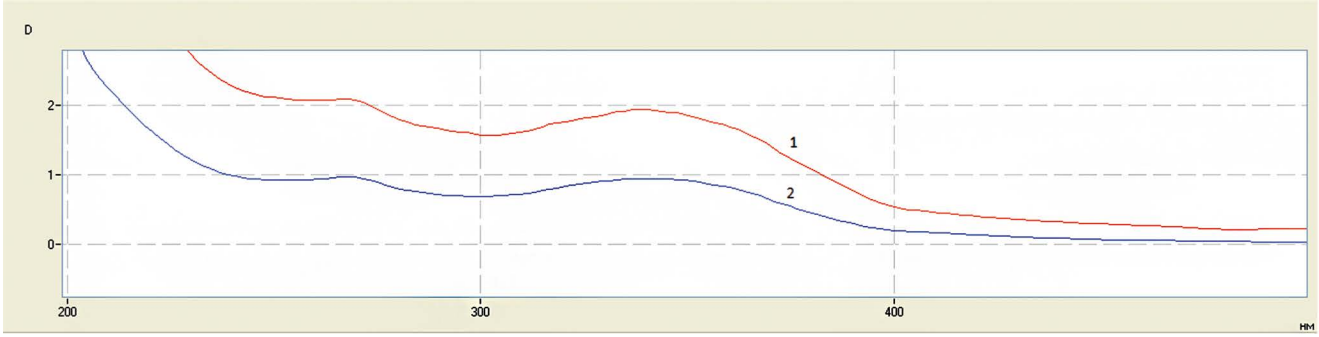


Рисунок 7. **УФ-спектр исходного этанольного извлечения из *Lemna minor* L. (1) и обработанного гексаном в соотношении 1:5 (2)**

Figure 7. **UV-spectra of original ethanolic extract from *Lemna minor* L. (1) and ethanolic extract treated with hexane in 1:5 ratio (2)**

Таблица 3. **Оценка воспроизводимости методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту**

Table 3. **Evaluation of the reproducibility of the method for the determination of phenolcarboxylic acids in terms of chlorogenic acid**

Уровень Level	W, %	Среднее Average	S^2	F	$F_{(5;5;0,025)}$	$S^2_{ср}$ $S^2_{average}$	RSD, %
80	0,309	0,317	$5,07 \times 10^{-5}$	2,82	7,15	$3,4 \times 10^{-5}$	1,90
	0,319						
	0,310						
	0,323						
	0,315						
	0,327						
	0,323	0,322	$1,80 \times 10^{-5}$				
	0,314						
	0,327						
	0,322						
	0,321						
	0,323						
100	0,310	0,313	$2,22 \times 10^{-5}$	3,29		$4,8 \times 10^{-5}$	2,11
	0,309						
	0,318						
	0,313						
	0,318						
	0,308						
	0,318	0,314	$7,29 \times 10^{-5}$				
	0,320						
	0,316						
	0,297						
	0,315						
	0,320						
120	0,324	0,321	$1,03 \times 10^{-5}$	2,08		$1,6 \times 10^{-5}$	1,22
	0,320						
	0,319						
	0,317						
	0,320						
	0,326						
	0,320	0,319	$2,14 \times 10^{-5}$				
	0,317						
	0,314						
	0,322						
	0,316						
	0,327						

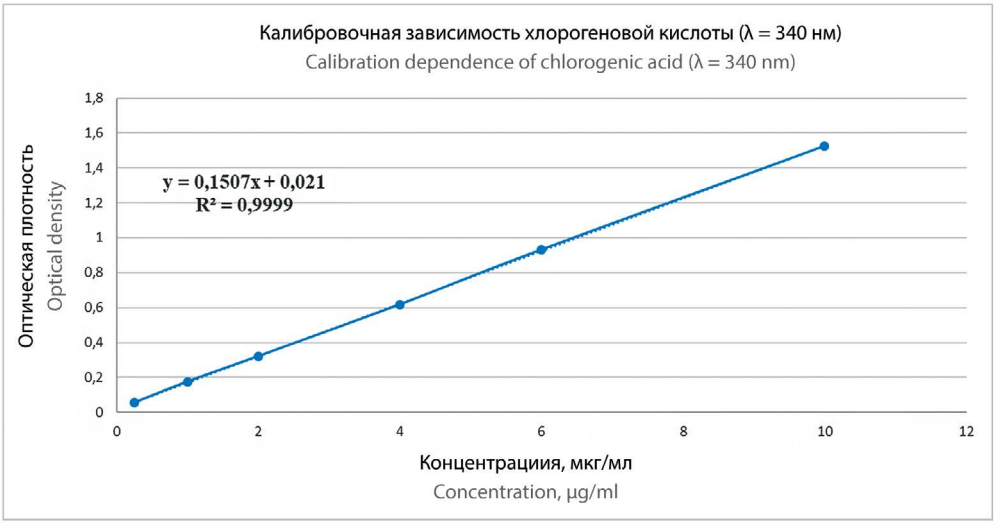


Рисунок 8. Калибровочная зависимость хлорогеновой кислоты в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/мл (λ = 340 нм)

Figure 8. Calibration dependence of chlorogenic acid in the range from 0.1 to 10 μg/ml (λ = 340 nm)

Таблица 4. Оценка правильности методики определения фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту (ХК)

Table 4. Evaluation of the correctness of the procedure for the determination of phenolcarboxylic acids in terms of chlorogenic acid (CA)

Уровень содержания, % Content, %	Введено ХК, мг/мл Injected CA, mg/ml	Найдено, мг/мл Determined, mg/ml	Δ
80	0,025	0,0651	99,83
100		0,0759	100,91
120		0,0885	98,47

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение внешних (макроскопических) и микроскопических признаков позволило определить характерные диагностические особенности, дающие возможность достоверно определять подлинность ряски малой (*Lemna minor*). К внешним признакам относятся: наличие обратнояйцевидных, эллиптических, реже округлых, непрозрачных, цельнокрайних листецов, одиночных или группами из 2–4, слегка выпуклых с верхней стороны и плоских с нижней стороны, зеленого или светло-зеленого цвета; одиночных волосовидных корней от бледно-зеленого до темно-коричневого цвета. К микроскопическим признакам относятся: наличие слабоизвилистых, сильноизвилистых и многоугольных клеток эпидермиса с продольно вытянутыми стенками; хорошо развитой аэренхимы, занимающей до 2/3 объема листеца с округло-эллиптическими межклетниками, диаметр которых в 6–12 раз больше клеток аэренхимы, и в 5–6 раз больше клеток верхнего эпидермиса; клеток-идиобластов с рафидами.

Таблица 5. Содержание биологически активных веществ в листьях *Lemna minor* L. (n = 3)

Table 5. The content of biologically active compounds in *Lemna minor* L. fronds (n = 3)

Место сбора Place of collection	Содержание фенолкарбоновых кислот, % The content of phenolcarboxylic acids, %	Содержание полисахаридов, % The content of polysaccharides, %
Томская область, Томский район, Коларовский тракт, озеро Коларовское Tomsk region, Tomsk district, Kolarovsky tract, lake Kolarovskoe	4,44 ± 0,10	8,12 ± 0,20
Томская область, Кожевниковский район, озеро Шубино Tomsk region, Kozhevnikovsky district, lake Shubino	5,47 ± 0,01	5,00 ± 0,50
Кемеровская область, река Иня Kemerovo region, Inya river	4,87 ± 0,11	4,98 ± 0,54
Кемеровская область, Степногутовский район, озеро Танай Kemerovo region, Stepnogutovsky district, Lake Tanay	5,05 ± 0,10	4,34 ± 0,14
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул. Радиостанция Novosibirsk region, Novosibirsk, Pervomaisky district, Radiostanciya street	4,66 ± 0,57	6,82 ± 0,14
Новосибирская область, г. Новосибирск, Первомайский район, ул. Ласточкина Novosibirsk region, Novosibirsk, Pervomaisky district, Lastochkina street	3,87 ± 0,11	5,88 ± 1,36
Новосибирская область на границе с Томской областью, озеро Щучье Novosibirsk region on the border with Tomsk region, Lake Shchuchye	4,29 ± 0,01	5,50 ± 0,58
X ± x	4,67 ± 0,52	5,88 ± 1,24

Разработаны методики количественного определения полисахаридов и фенолкарбоновых кислот в траве ряски малой. Для полисахаридов, определяемых гравиметрически (прямой метод определения вещества), установлен диапазон содержания 4,34–8,12 %. Для фенолкарбоновых кислот, определяемых спектрофотометрическим методом, в пересчете на хлорогеновую кислоту, установлен диапазон 3,87–5,47 %. Методика спектрофотометрического определения фенолкарбоновых кислот валидирована по показателям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность и правильность – и апробирована на 7 образцах сырья из Западно-Сибирского региона.

Разработанные показатели подлинности, методики количественного определения могут быть использованы при разработке проекта фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Ряски трава».

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленовская Л. М. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 6. Семейства Butomaceae – Typhaceae. М.: Товарищество научных изданий; 2014. 392 с.
2. Синяков А. Ф. Стимуляторы жизни. М.: Молодая гвардия; 1990. 192 с.
3. Абдиев М. Ряски водоемов Узбекистана и опыт их массового культивирования: Диссер. канд. биол. наук. Ташкент. 1970. 194 с.
4. Vladimirova I. N., Georgiyants V. A. Biologically active compounds from *Lemna minor* S. F. Gray. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;47(11):599–601. DOI: 10.1007/s11094-014-1016-8.
5. Qiao X., He W. N., Xiang C., Han J., Wu L. J., Guo D. A., Ye M. Qualitative and Quantitative Analyses of Flavonoids in *Spirodela polyrrhiza* by High performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2011;22(6):475–483. DOI: 10.1002/pca.1303.
6. Günter E. A., Popeiko O. V., Ovodov Yu. S. Isolation of Polysaccharides from the Callus Culture of *Lemna minor* L. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004;40(1):80–83. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000010359.68528.fe.
7. Rusoff L. L., Blakeney E. W., Culley D. D. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980;28(4):848–850. DOI: 10.1021/jf60230a040.
8. Адекенов С. М., Данилец М. Г., Ивасенко С. А., Никифоров Л. А., Кривощеков С. В., Лигачёва А. А., Трофимова Е. С., Шерстобоев Е. Ю., Жданов В. В., Белоусов М. В. Фенольные соединения этанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017;16(3):5–15. DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-5-15.
9. Song W. Y., Choi J. H. Total Phenols, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of *Spirodela polyrhiza* Extracts. *Journal of Life Science*. 2017;27(2):180–186. DOI: 10.5352/JLS.2017.27.2.180.
10. Gulcin I., Kirecci E., Akkemik E., Topal F., Hisar O. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). *Turkish Journal of Biology*. 2010;34(2):175–188. DOI: 10.3906/biy-0806-7.
11. Al-Snai A. E. *Lemna minor*: Traditional Uses, Chemical Constituents and Pharmacological Effects-A Review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2019;9(8):6-11.
12. Khasina E. I., Sgrebneva M. N., Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Ovodov Y.S. Gastroprotective Effect of Lemnan, a Pectic Polysaccharide from *Lemna minor* L. *Doklady Biological Sciences*. 2003;390(3):204–206. DOI: 10.1023/A:1024437012646.
13. Cho H. R., Choi H. S. Effects of Anticoagulant from *Spirodela polyrhiza* in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003;67(4):881–883. DOI: 10.1271/bbb.67.881.
14. Томашевская О. Ю., Даргаева Т. Д., Сокольская Т. А. Изучение качественного состава и определение содержания фенольных соединений в корневищах иглицы шиповатой (*Ruscus aculeatus* L.). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2009;2:42–44.

REFERENCES

1. Belenovskaya L. M. *Rastitel'nye resursy Rossii. Dikorastushchie tsvetkovye rasteniya, ikh komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. Tom 6. Semeystva Butomaceae – Typhaceae* [Plant sources of Russia. Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Volume 6. Families Butomaceae – Typhaceae]. Moscow: Tovarishestvo nauchnih izdanii; 2014. 392 p. (In Russ.).
2. Sinyakov A. F. *Stimulyatory zhizni* [Life stimulators]. Moscow: Molodaya gvardiya; 1990. 192 p. (In Russ.).
3. Abdiev M. *Ryaski vodoemov Uzbekistana i opyt ikh massovogo kul'tivirovaniya* [Duckweeds of Uzbekistan ponds and the experience of their mass cultivation] [dissertation]. Tashkent. 1970. 194 p. (In Russ.).
4. Vladimirova I. N., Georgiyants V. A. Biologically active compounds from *Lemna minor* S. F. Gray. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;47(11):599–601. DOI: 10.1007/s11094-014-1016-8.
5. Qiao X., He W. N., Xiang C., Han J., Wu L. J., Guo D. A., Ye M. Qualitative and Quantitative Analyses of Flavonoids in *Spirodela polyrrhiza* by High performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2011;22(6):475–483. DOI: 10.1002/pca.1303.
6. Günter E. A., Popeiko O. V., Ovodov Yu. S. Isolation of Polysaccharides from the Callus Culture of *Lemna minor* L. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2004;40(1):80–83. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000010359.68528.fe.
7. Rusoff L. L., Blakeney E. W., Culley D. D. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980;28(4):848–850. DOI: 10.1021/jf60230a040.
8. Adekenov S. M., Danilets M. G., Ivasenko S. A., Nikiforov L. A., Krivoschekov S. V., Ligacheva A. A., Trofimova E. S., Sherstoboev E. Yu., Zhdanov V. V., Belousov M. V. Phenolic compounds of ethanolic extracts from *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. and *Lemna polyrrhiza* L. Schleid and their immunomodulative activity. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*. 2017;16(3):5–15. (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2017-3-5-15.
9. Song W. Y., Choi J. H. Total Phenols, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of *Spirodela polyrhiza* Extracts. *Journal of Life Science*. 2017;27(2):180–186. DOI: 10.5352/JLS.2017.27.2.180.
10. Gulcin I., Kirecci E., Akkemik E., Topal F., Hisar O. Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). *Turkish Journal of Biology*. 2010;34(2):175–188. DOI: 10.3906/biy-0806-7.
11. Al-Snai A. E. *Lemna minor*: Traditional Uses, Chemical Constituents and Pharmacological Effects-A Review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 2019;9(8):6-11.
12. Khasina E. I., Sgrebneva M. N., Ovodova R. G., Golovchenko V. V., Ovodov Y.S. Gastroprotective Effect of Lemnan, a Pectic Polysaccharide from *Lemna minor* L. *Doklady Biological Sciences*. 2003;390(3):204–206. DOI: 10.1023/A:1024437012646.
13. Cho H. R., Choi H. S. Effects of Anticoagulant from *Spirodela polyrhiza* in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2003;67(4):881–883. DOI: 10.1271/bbb.67.881.
14. Tomashevskaya O. Yu., Dargaeva T. D., Sokol'skaya T. A. Study of qualitative content and determination of phenolic compounds in rhizomes of butcher's broom *Ruscus aculeatus* L. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2009;2:42–44. (In Russ.).

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ-ВЫСТАВКА

аптека

БИЗНЕС-ФОРМАТ | 2021

КЛЮЧЕВОЕ СОБЫТИЕ РОССИЙСКОГО АПТЕЧНОГО РЫНКА

APTEKAEXPO.RU

+7 (495) 925-65-61/62
info@aptekaexpo.ru

2-4 МАРТА 2021

МОСКВА • EVENT HALL ДАНИЛОВСКИЙ

Организатор

ЕВРОЭКСПО

При поддержке

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

РСПП

РААС

РЕКЛАМА

18+

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89
УДК 54.061:54.062:615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.)

В. Г. Лужанин[1], А. К. Уэйли[1], А. О. Понкратова[1]*, Е. А. Гришукова[1], И. С. Сулоев[1], С. Н. Смирнов[2], Е. Б. Серебряков[2]

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14
2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9

***Контактное лицо:** Понкратова Анастасия Олеговна. **E-mail:** anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: В. Г. Лужанин – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; А. К. Уэйли – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; А. О. Понкратова – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Е. А. Гришукова – https://orcid.org/0000-0002-6615-6855; И. С. Сулоев – https://orcid.org/0000-0002-2758-9869; С. Н. Смирнов – https://orcid.org/0000-0003-2042-337X; Е. Б. Серебряков – https://orcid.org/0000-0002-1021-6871.

Статья поступила: 25.12.2020. **Статья принята в печать:** 27.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Среди разнообразных групп лекарственных препаратов диуретики остаются одним из наиболее популярных классов, применяемых для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и почек. В то же время широко используемые синтетические диуретические средства способны вызывать большое количество побочных эффектов, таких как нарушение электролитного, кислотно-щелочного и водного балансов, углеводного и липидного обменов. В связи с этим выделение индивидуальных веществ растительного происхождения – новых потенциальных фармацевтических субстанций для лечения заболеваний мочевыделительной системы – является актуальным. В настоящем исследовании проводилось выделение индивидуальных соединений из надземных частей стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). Для суммарных извлечений, полученных из исследуемого сырья, ранее описана диуретическая активность.

Цель. Разработать методики выделения индивидуальных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа из надземных частей *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis*, установить химическую структуру выделенных индивидуальных веществ.

Материалы и методы. Надземные части *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis* были собраны в питомнике лекарственных растений Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (далее – СПХФУ) (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года. Анализ фракций осуществляли методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором. Выделение индивидуальных соединений осуществляли методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Smartline, Knauer, Германия). Установление структуры соединений осуществляли с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия), а также 1D и 2D ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия).

Результаты и обсуждение. С помощью разработанных методик выделено три индивидуальных соединения (**1-3**) из надземной части *Ononis arvensis*. Соединения **1** и **2** являются изофлавоноидами – псевдобаптигенин-7-O-ß-D-глюкопиранозид и формононетин-7-O-ß-D-глюкопиранозид соответственно. Соединение **3** является флавоноидом – кемпферол-3-O-ß-D-глюкопиранозид (астрагалин). Также было выделено четыре индивидуальных соединения (**4-7**) из надземной части *Solidago canadensis* – кверцетин-3-O-ß-D-6''-ацетилглюкопиранозид, изорамнетин-3-O-ß-D-рутинозид (нарциссин), кверцетин-3-O-рутинозид (рутин) и кверцетин соответственно. Все индивидуальные соединения выделены с помощью метода препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии из указанного сырья впервые.

Заключение. В результате исследования надземной части *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis* впервые разработаны методики выделения 7 (семи) индивидуальных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа, была определена химическая структура всех выделенных соединений. Предполагается последующее исследование биологической активности выделенных индивидуальных веществ.

Ключевые слова: стальник полевой, золотарник канадский, полифенолы, флавоноиды, изофлавоноиды, вторичные метаболиты, индивидуальные вещества.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. О. Понкратова, Е. А. Гришукова и И. С. Сулоев выполнили экспериментальную часть по выделению индивидуальных соединений. С. Н. Смирнов выполнил исследования методом ЯМР-спектроскопии. Е. Б. Серебряков выполнил исследование методом масс-спектрометрии. А. К. Уэйли интерпретировал результаты ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. В. Г. Лужанин руководил научным исследованием. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Благодарность. Наименование НИОКТР: Разработка технологий культивирования лекарственных растений и технологий получения индивидуальных веществ из растительного сырья. Регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118122790031-7. Дата регистрации: 27.12.2018.

Для цитирования: Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89

© Лужанин В. Г., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Гришукова Е. А., Сулоев И. С., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., 2021
© Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., 2021

Isolation of Individual Compounds from the Terrestrial Parts of *Ononis Arvensis* L. and *Solidago Canadensis* L.

Vladimir G. Luzhanin[1], Andrei K. Whaley[1], Anastasiia O. Ponkratova[1]*, Ekaterina A. Grishukova[1], Ivan S. Suloev[1], Sergey N. Smirnov[2], Evgeny B. Serebryakov[2]

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia
2 – St Petersburg University, Saint Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya naberezhnaya, Saint-Petersburg, 199034, Russia

***Corresponding author:** Anastasiia O. Ponkratova. **E-mail:** anastasiya.ponkratova@yandex.ru

ORCID: Vladimir G. Luzhanin – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; Andrei K. Whaley – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924;
Anastasiia O. Ponkratova – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Ekaterina A. Grishukova – https://orcid.org/0000-0002-6615-6855;
Ivan S. Suloev – https://orcid.org/0000-0002-2758-9869; Sergey N. Smirnov – https://orcid.org/0000-0003-2042-337X; Evgeny B. Serebryakov – https://orcid.org/0000-0002-1021-6871.

Received: 25.12.2020. **Revised:** 27.01.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Among the different groups of drugs, diuretics are one the most popular classes that have been used for treatment of cardiovascular system and kidney diseases. At the same time, synthetic diuretics which are widely used, cause large amounts of side effects, such as violation of electrolyte, acid-base and water balances, carbohydrate and lipid metabolism. Therefore, it is important to search for individual compounds of plant origin – potential pharmaceutical substances for the treatment of urinary tract diseases. In this study individual compounds were isolated from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. The diuretic activity of the summary extracts of Ononis arvensis and Solidago canadensis has previously been proven.

Aim. Method development for the isolation of individual compounds, using modern physicochemical methods of analysis, from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* and *Solidago canadensis* and the elucidation of their structure.

Materials and methods. Aerial parts of *Ononis arvensis* and *Solidago canadensis* were collected in the Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University (SPCPU) Nursery Garden of Medicinal Plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozersk highway, 38 km) in August 2019 and identified by Dr. Goncharov Mikhail of the Saint-Petersburg chemical-pharmaceutical university, Saint-Petersburg, Russia. Fraction analysis were preformed with analytical high-performance liquid chromatography using a LC-20 Prominence (Shimadzu corp., Japan) with a SPD-M20A diode-array detector. Isolation of individual compounds was carried out by preparative high-performance liquid chromatography using a Smartline (Knauer, Germany). The structures of the isolated compounds were elucidated using 1D and 2D NMR experiments (Bruker Avance III 400 MHz) along with HR-ESI-MS (Bruker Micromass Q-TOF).

Results and discussion. Using the developed methods, from the aerial part of the field restharrow (*O. arvensis*) we managed to isolate and characterised three individual compounds (**1-3**). Compounds **1** and **2** are isloflavonoids – pseudobaptigenin-7-O-ß-D-glucopyranoside and formononetin-7-O-ß-D-glucopyranoside, respectively. Compound (**3**) is a flavonoid – kaempferol-3-O-ß-D-glucopyranoside (astragalin). All compounds were isolated for *O. arvansis* for the first time. Along with this, four individual compounds (**4-7**) were isolated from the aerial part of the canadian goldenrod (*S. canadensis*), namely, quercetin-3-O-ß-D-6''-acetylglucopyranoside, isoramnetin-3-O-ß-D-rutinoside (narcissin), quercetin-3-O-rutinoside (rutin) and quercetin, respectively.

Conclusion. As a result of the research, methods have been developed for the isolation of 7 individual compounds, using modern physicochemical methods of analysis, from the aerial parts of *Ononis arvensis* and *Solidago canadensis*, the structures of all the isolated compounds were elucidated. Future assessment of the isolated compounds biological activity is presumed.

Keywords: *Solidago canadensis*, *Ononis arvensis*, polyphenols, flavonoids, isoflavonoids, secondary metabolites, individual compounds.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Authors Anastasiia O. Ponkratova, Ekaterina A. Grishukova and Ivan S. Suloev – experimental part. Sergey N. Smirnov – preformed the NMR experiments. Evgeny B. Serebyrakov – preformed the HR-ESI-MS experiments. Andrei K. Whaley – processing of the NMR-experiments and HR-ESI-MS results. Vladimir G. Luzhanin – curation of the research. All authors took part in the discussion of the results.

Acknowledgment. NIOKTR name: Development of technologies for the cultivation of medicinal plants and technologies for obtaining individual substances from plant materials. NIOKTR registration number: AAAA-A18-118122790031-7. Date of registration: 27.12.2018.

For citation: Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(1):83–89. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89

ВВЕДЕНИЕ

Ononis arvensis (стальник полевой) – многолетнее травянистое растение (семейства *Fabaceae*). Ареал произрастания охватывает практически всю территорию Кавказа и Закавказья, большую часть Европейской территории России, Украины, Белоруссии, Молдавии, часть Прибалтики, достигая берегов Финского залива [1]. Растение светолюбивое, произрастает на слабокислых или нейтральных почвах, богатых гумусом, азотом и с достаточным увлажнением, по берегам водоемов, на лесных опушках и полянах, иногда на окраинах болот [1]. В качестве основных вторичных метаболитов стальника полевого можно выделить полифенольные соединения, среди которых представительными группами являются изофлавоноиды и дигидроизофлавоноиды [2, 3], птерокарпаны [2], флавоноиды [4], фенолкарбоновые кислоты [2, 5], также встречаются гидролизуемые танины и стильбеноиды [4]. Экстракты, полученные из стальника полевого, обладают диуретической, желчегонной, анальгезирующей, антигипоксической и противомикробной

активностью [3]. В народной медицине данное растение применяется для лечения заболевания мочевого пузыря и почек, геморроя, заболеваний печени и кожных заболеваний [4].

Solidago canadensis (золотарник канадский) представляет собой многолетнее травянистое растение (сем. *Asteraceae*), родиной которого является Северная Америка (Канада, США, север Мексики) [6]. *Solidago canadensis* широко распространен в таких странах, как Китай, Россия и страны СНГ, Япония, Тайвань, Европейские страны, Австралия и Новая Зеландия [7]. Типичными местами обитания данного растения являются луга, пастбища, саванны, известняковые поляны, участки вдоль дорог и канав [7]. Основной группой вторичных метаболитов, ранее обнаруженных в *Solidago canadensis,* являются соединения полифенольной природы, а именно флавоноиды и их агликоны [8–11], фенолкарбоновые кислоты [8, 10–12], сапонины [13], ди- и тритерпеноиды [14, 15], также встречаются дубильные вещества [16]. Помимо выраженной диуретической активности [10, 11, 17], экстракты золотарника канадского обладают противомикробной, антиоксидантной [16], противовоспалительной, противоопухолевой [15], нефролитической и спазмолитической [11] активностью.

Фитофармацевтические препараты успешно применяются в лечении заболеваний мочевыделительной системы, особенно с параллельным введением синтетических препаратов, используемых в качестве диуретиков [11]. Широко используемые синтетические диуретические средства способны вызывать большое количество побочных эффектов, таких как нарушение электролитного, кислотно-щелочного и водного балансов, углеводного и липидного обменов [18]. В связи с этим выделение индивидуальных веществ растительного происхождения – новых потенциальных фармацевтических субстанций для лечения заболеваний мочевыделительной системы – является актуальным. Диуретическую активность суммарных извлечений из *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis* исследователи связывают с наличием фенольных соединений, флавоноидов и сапонинов [11, 19].

Таким образом, целью настоящего исследования является разработка методик выделения индивидуальных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа из надземных частей *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis*, установление химической структуры выделенных индивидуальных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Надземные части *Ononis arvensis* и *Solidago canadensis* были собраны в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года.

Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, при 254 и 280 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL LC-18, 25 см × 4.6 мм, 5 мкм. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Температура анализа – 40 °C. Элюент: вода (компонент A), ацетонитрил (компонент B) с содержанием ТФУ 0,1 % (с H_2O : CH_3CN 5:95 до H_2O : CH_3CN 0:100, *v/v*).

Выделение индивидуальных соединений осуществляли методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором, при длине волны 254 нм. Применялась хроматографическая колонка Kromasil 100-5C18, 250 × 30 мм. Скорость потока элюента – 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент A), ацетонитрил (компонент B) с содержанием ТФУ 0,1 % (с H_2O : CH_3CN 5:95 до H_2O : CH_3CN 50:50, по объему).

Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III, 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Масс-спектры высокого разрешения и спектры ЯМР были сняты в ресурсном образовательном центре СПбГУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании из надземной части *O. arvensis* авторам удалось выделить и охарактеризовать структуру изофлавоноидов (**1** и **2**) и флавоноида (**3**). Из надземной части золотарника канадского авторами выделены и идентифицированы четыре индивидуальных соединения – производные кверцетина и изорамнетина [8, 11] (**4-7**) (рисунок 1).

Перед экстракцией сырье подвергалось воздушно-теневой сушке, измельчалось и просеивалось через сито с диаметром отверстий 1,0 мм. Проводилась многократная экстракция 500 г сырья стальника полевого 3000 миллилитрами 96%-го этилового спирта. Полученное извлечение выпаривалось на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °C до приблизительного объема 200 мл, после чего проводилась многократная жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖ-экстракция). На первом этапе ЖЖ-экстракция проводились с равными объемами гексана до того момента, как вновь добавляемые порции гексана переставали приобретать видимую окраску. Затем к спиртовому извлечению добавляли 50 мл воды очищенной и по аналогии проводили ЖЖ-экстракцию с равными объемами дихлорметана. Остаточную водно-спиртовую подфракцию выпаривали до приблизительного объема 100 мл и загружали на откры-

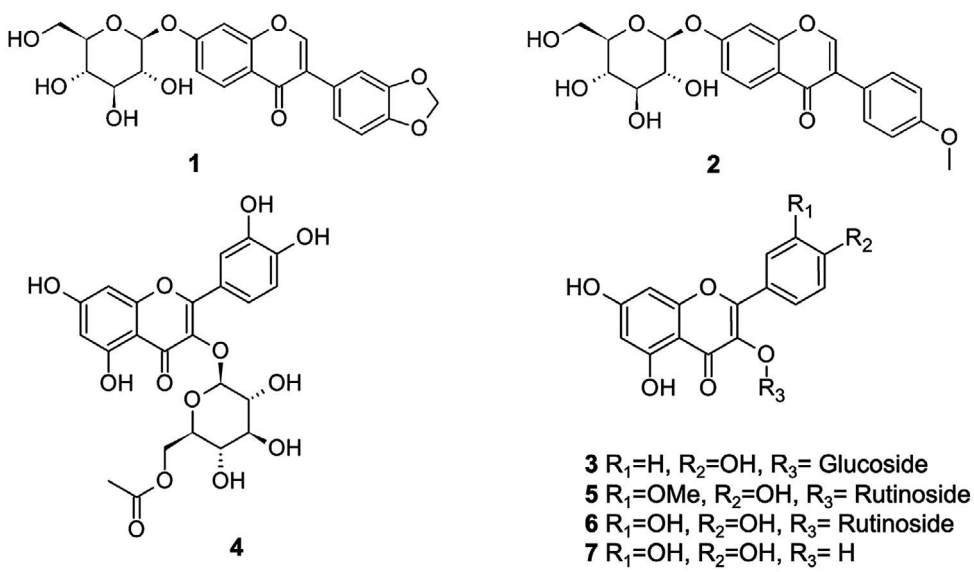


Рисунок 1. Структуры выделенных соединений 1-7

Figure 1. Structures of the isolated compounds 1-7

тую колонку с обращенно-фазовым сорбентом Dianion HP 20, марки SUPELCO. Проводили градиентное элюирование с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % (с H_2O : 96 % EtOH 100:0 до H_2O : 96 % EtOH 0:100, по объему). Сбор элюата осуществлялся в колбы по 100 мл. Параллельно проводился скрининг собираемого из колонки элюата методом ТСХ в системе БУВ 4:1:2 для дальнейшего его объединения.

Элюат, собранный из колонки при концентрации спирта 70 %, объединялся в 4 фракции согласно ТСХ, которые затем сгущались на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до объема 10–15 мл. Фракции № 1 и 4 загружались на препаративный высокоэффективный жидкостный хроматограф, в результате чего из фракции № 4 были выделены соединения: **1** (5,11 мг, t_R = 22,274 мин); соединение **2** (6,92 мг, t_R = 22,701 мин), а из фракции № 1 – соединение **3** (2,96 мг, t_R = 20,435 мин).

Для выделения индивидуальных соединений из сырья *S. canadensis* проводилась многократная экстракция 484 г сырья золотарника 4760 миллилитрами 80%-го этилового спирта [20]. Полученное извлечение выпаривалось на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С, до приблизительного объема 200 мл, после чего проводилась многократная ЖЖ-экстракция. На первом этапе ЖЖ-экстракция проводились с равными объемами гексана до того момента, как вновь добавляемые порции гексана переставали приобретать видимую окраску. Затем к спиртовому извлечению добавляли 100 мл воды очищенной и по аналогии проводили ЖЖ-экстракцию с равными объемами бутанола. Объединенную бутанольную подфракцию выпаривали до приблизительного объема 100 мл, загружали на открытую колонку с сорбентом Sephadex LH 20, марки GE Healthcare и проводили изократическое элюирование этиловым спиртом 96 %. Сбор элюата осуществлялся в пробирки. Параллельно проводился скрининг полученных из колонки порций элюата методом ТСХ в системе БУВ 4:1:2 для дальнейшего их объединения. Порции элюата, содержащие соединения **4-7**, объединялись и упаривались на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до объема 10–15 мл. Полученная фракция подвергалась очистке на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение **4** (8,2 мг, t_R = 20,905 мин); соединение **5** (3,02 мг, t_R = 20,672 мин); соединение **6** (6,93 мг, t_R = 19,236 мин) и соединение **7** (3,34 мг, t_R = 23,687 мин).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Соединение 1 представляет собой белое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при λ_{max} = 248, 262, 292 нм. HR-ESI-MS отображает пик молекулярного иона $[M+H]^+$ *m/z* 445,1134 (расч. 445,1135), что соответствует молекулярной формуле $C_{22}H_{20}O_{10}$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 8.45 (1H, с, H-2), 7.99 (1H, д, *J* = 8.9, H-5), 7.13 (1H, дд, *J* = 8.9, 2.0, H-6), 7.19 (1H, д, *J* = 2.0, H-8), 7.12 (1H, д, *J* = 1.5, H-2′), 6.94 (1H, д, *J* = 8.1, H-5′), 7.04 (1H, дд, *J* = 8.1, 1.5, H-6′), 6.03 (2H, с, O-CH_2-O-3′,4′), 5.08 (1H, д, *J* = 7.6, H-1″), 3.25 (1H, м, H-2″), 3.35 (1H, м, H-3″), 3.17 (1H, м, H-4″), 3.40 (1H, м, H-5″), 3.61 (1H, м, H-6a″), 3.45 (1H, м, H-6b″), 5.51 (1H, д, *J* = 5.0, OH-2″), 5.34 (1H, д, *J* = 3.8, OH-3″), 5.31 (1H, д, *J* = 4.6, OH-4″), 4.78 (1H, т, *J* = 7.0, 5.4, OH-6″).

Данные УФ- и ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о принадлежности соединения **1** к группе изофлавоноидов и наличии в его составе остатка глюкозы в 7 положении, что было установлено по ^{1}H и NOESY ЯМР-спектрам. В результате анализа ЯМР- и масс-спектров и сравнения их с литературными данными соединение **1** было идентифицировано как псевдобаптигенин-7-O- β-D-глюкопиранозид [2].

Соединение 2 – белое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при λ_{max} = 231, 248, 265, 310 нм. HR-ESI-MS дает молекулярный ион $[M+H]^+$ *m/z* 431,1341 (расч. 431,1342), что соответствует молекулярной формуле $C_{22}H_{22}O_9$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 8.44 (1H, с, H-2), 8.00 (1H, д, *J* = 8.9, H-5), 7.13 (1H, дд, *J* = 8.9, 2.0, H-6), 7.19 (1H, д, *J* = 2.0, H-8), 7.49 (2H, д, *J* = 8.6, H-2′,6′), 6.96 (2H, д, *J* = 8.6, H-3′,5′), 5.08 (1H, д, *J* = 7.8, H-1′′), 3.25 (1H, м, H-2′′), 3.35 (1H, м, H-3′′), 3.18 (1H, м, H-4′′), 3.41 (1H, м, H-5′′), 3.62 (1H, м, H-6a′′), 3.35 (1H, м, H-6b′′), 5.51 (1H, д, *J* = 4.9, OH-2′′), 5.34 (1H, д, *J* = 4.0, OH-3′′), 5.31 (1H, д, *J* = 4.6, OH-4′′), 4.78 (1H, т, *J* = 6.5, 6.0, OH-6′′), 3.75 (3H, с, OMe-4′). Присутствие метоксигруппы в 4′-положении подтверждено наличием корреляции протонов метоксигруппы с протонами в 3′ и 5′ положениях в спектрах NOESY. Наличие остатка глюкозы в 7 положении установлено по наличию корреляции между аномерным протоном и протонами в 6 и 8 положениях кольца А в спектрах NOESY. На основании анализа ^{1}H, COSY и NOESY ЯМР-спектров, а также масс-спектра высокого разрешения соединение **2** было идентифицировано как формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид.

Соединение 3 – желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы поглощения в УФ-спектре при λ_{max} = 213, 249, 266, 346 нм. HR-ESI-MS дает молекулярный ион $[M+H]^+$ *m/z* 449,1083 (расч. 449,1084), что соответствует молекулярной формуле $C_{21}H_{20}O_{11}$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 6.31 (1H, д, *J* = 1.7, H-6), 6.56 (1H, д, *J* = 1.7, H-8), 7.98 (2H, д, *J* = 8.9, H-2′,6′), 6,92 (2H, д, *J* = 8.9, H-3′,5′), 5.33 (1H, д, *J* = 7.5, H-1′′), 3.15–3.69 (H-2′′-H-6′′), 5.15 (1H, д, *J* = 4.4, OH-2′′), 4.92 (1H, д, *J* = 6.0, OH-3′′), 4.69 (1H, д, *J* = 4.1, OH-4′′), 4.73 (1H, дд, *J* = 6.5, 6.0, H-6′′), 12.53 (1H, с, H-5), 11.48 (1H, уш. с, OH-7), 10.66 (1H, с, OH-4′). На основании анализа ^{1}H ЯМР-спектров и в сравнения с литературными данными установлено, что остаток глюкозы находится в положении 3 [21]. Изложенные данные позволяют предполагать, что соединение **3** является флавоноидом – кемпферол-3-O-β-D-глюкопиранозидом (астрагалином).

Соединение 4 получено как желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр соединения имеет максимумы поглощения при λ_{max} = 215, 249, (270), 349 нм. HR-ESI-MS дает пик молекулярного иона $[M+H]^+$ *m/z* 507,1138 (расч. 507,1139), что соответствует молекулярной формуле $C_{23}H_{22}O_{13}$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 6.29 (1H, д, *J* = 1.9, H-6), 6.54 (1H, д, *J* = 1.9, H-8), 7.60 (1H, д, *J* = 2.1, H-2′), 6.90 (1H, д, *J* = 8.5, H-5′), 7,50 (1H, дд, *J* = 8.5, 2.1, H-6′), 5.38 (1H, д, *J* = 7.4, H-1′′), 4.11 (1H, дд, *J* = 12.0, 1.7, H-6a′′), 3.92 (1H, дд, *J* = 12.0, 6.2, H-6b′′), 3.0–3.35 (H-2′′-5′′), 1.69 (3H, с, OAc-6′′), 12.58 (1H, с, OH-5), 11.36 (1H, с, OH-7), 9.40 (1H, с, OH-3′), 9.90 (1H, с, OH-4′). Наличие и расположение ацетильной группы в 6′′ положении подтверждается ^{1}H и NOESY ЯМР-спектрами. Путем анализа ЯМР- и масс-спектральных данных, а также сравнения их с литературными данными вещество **4** идентифицировано как кверцетин-3-O-β-D-6′′-ацетилглюкопиранозид [11].

Соединение 5 – желтое кристаллическое вещество, имеющее два максимума поглощения в УФ-спектрах – 253 и 352 нм. HR-ESI-MS отображает пик молекулярного иона $[M+H]^+$ *m/z* 626,1846 (расч. 626,1847), что соответствует молекулярной формуле $C_{28}H_{33}O_{16}$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 6.31 (1H, д, *J* = 2.0, H-6), 6.54 (1H, д, *J* = 2.0, H-8), 7.81 (1H, д, *J* = 2.0, H-2′), 7.01 (1H, д, *J* = 8.5, H-5′), 7.48 (1H, дд, *J* = 8.5, 2.0, H-6′), 5.42 (1H, д *J* = 7.5, H-1′′), 4.41 (1H, уш. с, H-1′′′), 0.95 (3H, д, *J* = 6.1, H-6′′′), 3.05–3.69 (H-2′′-6′′, H-2′′′-5′′′), 12.53 (1H, с, OH-5), 11.34 (1H, с, OH-7), 10.02 (1H, с, OH-3′), 3.80 (3H, с, OMe-4′). В результате анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными соединение **5** было идентифицировано как изорамнетин-3-O-β-D-рутинозид (нарциссин) [11].

Соединение 6 выделено как желтое кристаллическое вещество. УФ-спектр имеет два максимума поглощения при 255 и 354 нм. HR-ESI-MS дает пик молекулярного иона при $[M+H]^+$ *m/z* 611,1611 (расч. 611,1612), что соответствует молекулярной формуле $C_{27}H_{30}O_{16}$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 6.27 (1H, д, *J* = 1.8, H-6), 6.50 (1H, д, *J* = 1.8, H-8), 7.56 (1H, д, *J* = 2.2, H-2′), 6.91 (1H, д, *J* = 8.4, H-5′), 7.53 (1H, дд, *J* = 8.4, 2.2, H-6′), 5.34 (1H, д, *J* = 7.4, H-1′′), 4.37 (1H, д, *J* = 0.8, H-1′′′), 0.97 (3H, д, *J* = 6.1, CH3-6′′′), 3.06–3.68 (CH-2′′-6′′, CH- 2′′′-5′′′), 12.56 (1H, с, OH-5), 11.29 (1H, с, OH-7), 9.32 (1H, уш. с, OH-3′), 9.83 (1H, уш. с, OH-4′). Путем анализа спектральных данных и сравнения их с литературными данными полученное соединение было идентифицировано как кверцетин-3-O-рутинозид (рутин) [11].

Соединение 7 получено как желтое кристаллическое вещество, имеющее максимумы поглощения в УФ-спектре при 254 и 370 нм. HR-ESI-MS дает пик молекулярного иона при $[M+H]^+$ *m/z* 303,0504 (расч. 303,0505), что соответствует молекулярной формуле $C_{15}H_{10}O_7$. ^{1}H-ЯМР (DMCO-d_6, δ, м.д., *J*/Гц): 6.27 (1H, д, *J* = 1.9, H-6), 6.54 (1H, д, *J* = 1.9, H-8), 7.65 (1H, д, *J* = 2.1, H-2′), 6.94 (1H, д, *J* = 8.5, H-5′), 7.52 (1H, дд, *J* = 8.5, 2.1, H-6′), 9.26 (1H, с, OH-3), 12.43 (1H, с, OH-5), 11.29 (1H, с, OH-7), 9.31 (1H, с, OH-3′), 9.81 (1H, с, OH-4′). Изучение спектральных данных позволило идентифицировать данное соединение как кверцетин [4].

Соединения **1-3** ранее были обнаружены в стальнике полевом методом HPLC-MS [2]. В настоящей ра-

боте впервые удалось выделить данные соединения из надземной части стальника полевого в индивидуальном виде.

Соединения **4-7** ранее были описаны для надземной части золотарника канадского, а также выделялись методом открытой колоночной хроматографии [11], однако авторами впервые была разработана методика выделения индивидуальных соединений с использованием препаративного ВЭЖХ. Разработанная авторами методика позволяет существенно упростить выделение индивидуальных соединений из указанного сырья, сократив количество стадий очистки на открытых колонках с семи до одной, что обеспечивает увеличение выхода индивидуальных соединений наряду с меньшими трудозатратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были разработаны методики выделения индивидуальных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа из растений, обладающих диуретической активностью (*Ononis arvensis* и *Solidago canadensis)*. С использованием данных методик из надземной части *Ononis arvensis* выделены и охарактеризованы два изофлавонода (**1** и **2**) и один флавоноид (**3**). Согласно данным 1D и 2D ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения, данные соединения представляют собой псевдобаптигенин-7-O-β-D-глюкопиранозид, формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид и кемпферол-3-O-β-D-глюкопиранозид соответственно. Также выделены и подтверждены структуры четырех индивидуальных соединений (**4-7**) из надземной части *Solidago canadensis* – кверцетин-3-O-(6»-O-ацетил)-β-D-глюкозид, изорамнетин-3-O-β-D-рутинозид, кверцетин-3-O-рутинозид (рутин) и кверцетин. Предполагается последующее исследование биологической активности выделенных индивидуальных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиков П. С. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. Москва: Картография; 1983. 340 с.
2. Gampe N., Darcsi A., Nedves A. N., Boldizsar I. et al. Phytochemical analysis of *Ononis arvensis* L. by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2018;54(2):1–30. DOI: 10.1002/jms.4308.
3. Тулайкин А. И., Бахтина С. М. Диуретическая и анальгезирующая активность извлечений из надземной части *Ononis arvensis* (Fabaceae). *Растительные ресурсы*. 2006;42(1):120–126.
4. Denes T., Papp N., Marton K., Kaszas A. et al. Polyphenol content of *Ononis arvensis* L. and *Rhinanthus serotinus* oborny used in the Transylvanian ethnomedicine. *International journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 2015;30(1):1301–1307.
5. Тулайкин А. И., Яковлев Г. П. Изучение химического состава травы стальника полевого. *Фармация*. 2007;2:10–11.
6. Сулоев И. С., Дудецкая Н. А., Теслов Л. С., Лужанин В. Г., Яковлев Г. П. О некоторых видах рода золотарник. *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2019;21(6):68–76. DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76.
7. Šutovska M., Capek P., Kocmálová M., Franová S., Pawlaczyk I., Gancarz R. Characterization and biological activity of *Solidago canadensis* complex. *International journal of biological macromolecules*. 2013;52:192–197. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.021.
8. Apáti P., Houghton P. J., Kite G., Steventon G. B. Kery A. HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (Solidago canadensis). *Chromatographia Supplement*. 2002;56:65–68. DOI: 10.1007/BF02494115.
9. Apáti P., Kéry Á., Houghton P. J., Steventon G. B., Kite G. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006;58:251–256. DOI: 10.1211/jpp.58.2.0013.
10. Kelly A. M., Oliveira T. B., Valverde S. S. Determination of the metabolic profile of *Solidago canadensis* using UFLC-PDA-ESI-TOF. *Rodriguesia*. 2020;71:1–6. DOI: 0000-0002-4006-811X.
11. Baki P. M. A., El-Sherei M. M., Khaleel A. E., Motaal A. A. A., Abdallah H. M. I. Aquaretic activity of *Solidago canadensis* L. cultivated in Egypt and determination of the most bioactive fraction. *Iranian Journal of Pharmaceutical research*. 2019;18(2):922–937. DOI: 10.22037/ijpr.2019.2390.
12. Zekič J., Vovk I., Glavnik V. Extraction and Analyses of flavonoids and phenolic acids from Canadian goldenrod and Giant goldenrod. *Forest*. 2020;12(1):40. DOI: 10.3390/f12010040.
13. Reznicek G., Jurenitsch J., Plasun M., Karhammer S., Haslinger E. et al. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1629–1633. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84222-E.
14. Anthonsen T., McCabe P. H., McCrindle R., Murray R. D. H. Constituents of *Solidago* species – I: The constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. *Tetrahedron*. 1969;25(10):2233–2239. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)82771-X.
15. Chaturvedula P. V. S., Zhou B.-N., Gao Z., Thomas S. J., Hecht S. M., Kingston D. G. I. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12(23):6271–6275. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.08.048.
16. Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Industrial crops and products*. 2015;74:803–809. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.014.
17. Савустьяненко А. В. Применение экстрактов золотарника обыкновенного (*Solidago virgaurea* L.) для лечения заболеваний мочевыводящих путей. *На допомогу практикуючому лікарю*. 2014;3(9):29–37.
18. Losse H., Zumkley H., Quante T. Side effects of diuretics. *Clinical and experimental hypertension*. 1983;5:309–320.
19. Сампиев А. М., Давитавян Н. А. Сравнительное изучение фармакологической активности экстрактов из травы и настойки из корней стальника полевого. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2006;12:102–105.
20. Сулоев И. С., Понкратова А. О., Дудецкая Н. А., Теслов Л. С., Лужанин В. Г. Стандартизация травы золотарника канадского. *Фармация*. 2020;69(8):13–20. DOI: 10.29296/25419218-2020-08-02.
21. Bylka W., Matlawska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research*. 2001;58(1):69–72.

REFERENCES

1. Chikov P. S. *Atlas arealov i resursov lekarstvennykh rasteniy SSSR* [Atlas of areas and resources of medicinal plants in the USSR]. Moscow: Kartografiya; 1983. 340 p. (In Russ.).
2. Gampe N., Darcsi A., Nedves A. N., Boldizsar I. et al. Phytochemical analysis of *Ononis arvensis* L. by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2018;54(2):1–30. DOI: 10.1002/jms.4308.
3. Tulaikin A. I., Bakhtina S. M. Diuretic and analgesic activity of extracts from ononis arvensis (fabaceae) above-ground part. *Rastitelnye Resursy*. 2006;42(1):120–126. (In Russ.).
4. Denes T., Papp N., Marton K., Kaszas A. et al. Polyphenol content of *Ononis arvensis* L. and *Rhinanthus serotinus* oborny used in the Transylvanian ethnomedicine. *International journal of pharmacognosy and phytochemistry*. 2015;30(1):1301–1307.

5. Tulaikin A. I., Yakovlev G. P. Investigation of the chemical composition of rest-harrow (*Ononis arvensis* L.). *Farmatsiya = Pharmacy*. 2007;2:10–11 (In Russ.).
6. Suloev I. S., Dudetskaya N. A., Teslov L. S., Luzhanin V. G., Yakovlev G. P. About some species of genus goldenrod. *Zhurnal nauchnykh statey «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke»*. 2019;21(6):68–76. (In Russ.). DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76.
7. Šutovska M., Capek P., Kocmálová M., Franová S., Pawlaczyk I., Gancarz R. Characterization and biological activity of *Solidago canadensis* complex. *International journal of biological macromolecules*. 2013;52:192–197. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.021.
8. Apáti P., Houghton P. J., Kite G., Steventon G. B. Kery A. HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (Solidago canadensis). *Chromatographia Supplement*. 2002;56:65–68. DOI: 10.1007/BF02494115.
9. Apáti P., Kéry Á., Houghton P. J., Steventon G. B., Kite G. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2006;58:251–256. DOI: 10.1211/jpp.58.2.0013.
10. Kelly A. M., Oliveira T. B., Valverde S. S. Determination of the metabolic profile of *Solidago canadensis* using UFLC-PDA-ESI-TOF. *Rodriguesia*. 2020;71:1–6. DOI: 0000-0002-4006-811X.
11. Baki P. M. A., El-Sherei M. M., Khaleel A. E., Motaal A. A. A., Abdallah H. M. I. Aquaretic activity of *Solidago canadensis* L. cultivated in Egypt and determination of the most bioactive fraction. *Iranian Journal of Pharmaceutical research*. 2019;18(2):922–937. DOI: 10.22037/ijpr.2019.2390.
12. Zekič J., Vovk I., Glavnik V. Extraction and analyses of flavonoids and phenolic acids from Canadian goldenrod and Giant goldenrod. *Forest*. 2020;12(1):40. DOI: 10.3390/f12010040.
13. Reznicek G., Jurenitsch J., Plasun M., Karhammer S., Haslinger E. et al. Four major saponins from *Solidago canadensis*. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1629–1633. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84222-E.
14. Anthonsen T., McCabe P. H., McCrindle R., Murray R. D. H. Constituents of *Solidago* species – I: The constitution and stereochemistry of diterpenoids from *Solidago canadensis* L. *Tetrahedron*. 1969;25(10):2233–2239. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)82771-X.
15. Chaturvedula P. V. S., Zhou B.-N., Gao Z., Thomas S. J., Hecht S. M., Kingston D. G. I. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12(23):6271–6275. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.08.048.
16. Deng Y., Zhao Y., Padilla-Zakour O., Yang G. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. *Industrial crops and products*. 2015;74:803–809. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.014.
17. Savust'yanenko A. V. *Primenenie ekstraktov zolotarnika obyknovennogo (Solidago virgaurea L.) dlya lecheniya zabolevaniy mochevy vodyashchikh putey* [The use of goldenrod extracts (*Solidago virgaurea* L.) for the treatment of diseases of the urinary tract]. *Na dopomogu praktikuyuchomu likaryu*. 2014;3(9):29–37. (In Ukraine).
18. Losse H., Zumkley H., Quante T. Side effects of diuretics. *Clinical and experimental hypertension*. 1983;5:309–320.
19. Sampiev A. M., Davitavjan N. A. Comparative studying of pharmacological activity of extracts from the herb and tinctures from the root *Ononis arvensis* L. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2006;12:102–105. (In Russ.).
20. Suloev I.S., Ponkratova A.O., Dudetskaya N.A., Teslov L.S., Luzhanin V.G. Standardization of Canadian goldenrod (*Solidago canadensis*) herb. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2020;69(8):13–20. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2020-08-02.
21. Bylka W., Matlawska I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research*. 2001;58(1):69–72.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-90-96
УДК 615.322:582.736:581.192:577

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Использование метода капиллярного электрофореза при определении количественного содержания мангиферина в траве видов рода копеечник (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.) флоры Северного Кавказа

Д. Р. Имачуева[1,2]*, Ф. К. Серебряная[1]

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ, филиал ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России), 357532, Россия, г. Пятигорск-32, пр. Калинина, д. 11
2 – Дагестанский государственный медицинский университет (ДГМУ), 367012, Россия, Республика Дагестан, г. Махачкала, пл. Ленина, д. 1

***Контактное лицо:** Имачуева Джавгарат Руслановна. **E-mail:** djakag01@gmail.com

ORCID: Д. Р. Имачуева – https://orcid.org/0000-0002-8953-3158; Ф. К. Серебряная – https://orcid.org/0000-0001-9409-9344.

Статья поступила: 08.10.2020. **Статья принята в печать:** 02.02.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Виды рода Копеечник (*Hedysarum* L.) семейства *Fabaceae* представляют значительный интерес в связи с накоплением группы биологически активных веществ, обладающих выраженной антибактериальной и противовирусной активностью, в отношении ДНК-содержащих вирусов.

Цель. Целью работы является разработка методики количественного определения мангиферина в надземной части видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., собранные на территории Северного Кавказа методом зонального капиллярного электрофореза.

Материалы и методы. Объектами исследования служили виды рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., собранные на территории Северного Кавказа. Регистрация электронных спектров проводилась на капиллярном электрофорезе «КАПЕЛЬ®-105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф.}/L_{общ.}$ = 50/60 см, ID = 75 мкм. В качестве стандартного образца использовали мангиферин (субстанция-порошок, содержание мангиферина ≥98 %, Sigma-Aldrich, Lot SLBP4044V).

Результаты и обсуждение. В результате комплексных фармакогностических исследований видов рода Копеечник, произрастающих на Северном Кавказе в естественных условиях, а также в условиях интродукции на территории Ботанического сада Пятигорского медико-фармацевтического института и Горного ботанического сада Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, нами разработана методика выделения и количественного определения мангиферина методом капиллярного электрофореза.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности применения метода зонального капиллярного электрофореза при анализе ксантонов, в том числе определения количественного содержания мангиферина. Наибольшим содержанием мангиферина (0,25 %) отличается *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., что подтверждает предположение, основанное на молекулярно-генетических исследованиях, так как именно этот вид относится к секции *Obscura*, как и копеечник альпийский, используемый для получения мангиферина. В связи с чем можно предложить данную методику для анализа ксантонового гликозида мангиферина наряду со спектрофотометрией и высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Ключевые слова: копеечник, *Hedysarum caucasicum*, мангиферин, ксантоны, капиллярный электрофорез.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Д. Р. Имачуева участвовала в проведениии эксперимента по разработке методики количественного определения, проводила статистическую обработку полученных результатов. Ф. К. Серебряная отвечала за организационную часть исследования, осуществляла планирование, постановку целей и задач исследования, участвовала в обсуждении полученных результатов. Вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в формате научной дискуссии.

Для цитирования: Имачуева Д. Р., Серебряная Ф. К. Использование метода капиллярного электрофореза при определении количественного содержания мангиферина в траве видов рода копеечник (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.) флоры Северного Кавказа. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):90–96. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-90-96

Use of Capillary Electrophoresis Method in Determination of Quantitative Content of Mangiferin in Grass of Species of Genus Hedysarum (*Hedysarum Caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum Grandiflorum* Pall., *Hedysarum Daghestanicum* Rupr. ex Boiss) of flora of the North Caucasus

Dzhavgarat R. Imachueva[1,2]*, Fatima K. Serebryanaya[1]

1 – Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinina av., Pyatigorsk-32, 357532, Russia
2 – Daghestan State Medical University, 1, Lenina Square, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000, Russia

***Corresponding author:** Dzhavgarat R. Imachueva. **E-mail:** djakag01@gmail.com

ORCID: Dzhavgarat R. Imachueva – https://orcid.org/0000-0002-8953-3158; Fatima K. Serebryanaya – https://orcid.org/0000-0001-9409-9344.

Received: 08.10.2020. **Revised:** 02.02.2021. **Published:** 25.02.2021

© Имачуева Д. Р., Серебряная Ф. К., 2021
© Imachueva D. R., Serebryanaya F. K., 2021

Abstract

Introduction. The species of the genus *Hedysarum* L. of the *Fabaceae* family are of significant interest in connection with the accumulation of a group of biologically active substances with antibacterial and antiviral activity against DNA-containing viruses.

Aim. The purpose of the work is to develop a method for the quantitative determination of mangiferin in the aboveground part of species of the genus *Hedysarum* L., *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex. Boiss. collected in the North Caucasus by zonal capillary electrophoresis.

Materials and methods. The objects of the study were species of the genus *Hedysarum* L., namely *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex. Boiss. collected in the North Caucasus. Registration of electronic spectra was carried out on capillary electrophoresis "KAPEL'®-105m" (OJSC "Lumex-marketing", Russia) with quartz capillary $L_{eff.}/L_{tol.}$ = 50/60 cm, ID = 75 μm. As a standard sample, mangiferin (substance-powder, mangiferin content ≥98 %, Sigma-Aldrich, Lot SLBP4044V) was used.

Results and discussion. As a result of comprehensive pharmacognostic studies of species of the kopecki genus growing in the North Caucasus under natural conditions, as well as under the conditions of introduction on the territory of the Botanical Garden of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute and the Mountain Botanical Garden of the Dagestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, we developed a method for the isolation and quantitative determination of mangiferin by capillary electrophoresis.

Conclusion. Studies show that the use of the zonal capillary electrophoresis method in the analysis of xanthones, including the determination of the quantitative content of mangiferin, is promising. The largest content of mangiferin (0.25 %) is distinguished by *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., which confirms the assumption based on molecular genetic studies, since it is this species that belongs to the Obscura section, as well as the alpine penny used to produce mangiferin. Therefore, it is possible to provide this technique for analysis of mangiferin xanthone glycoside along with spectrophotometry and high performance liquid chromatography.

Keywords: *Hedysarum caucasicum*, mangiferin, xanthones, capillary electrophoresis.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Dzhavgarat R. Imachueva participated in an experiment to develop a quantitative methodology and conducted statistical processing of the results. Fatima K. Serebryanaya was responsible for the organizational part of the study, planned, set goals and objectives of the study, participated in the discussion of the results. The above authors participated in a scientific discussion.

For citation: Imachueva D. R., Serebryanaya F. K. Use of capillary electrophoresis method in determination of quantitative content of mangiferin in grass of species of genus hedysarum (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.) of flora of the North Caucasus. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):90–96. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-90-96

ВВЕДЕНИЕ

Группа ксантонов в настоящее время представляет значительный интерес с фармакологической точки зрения [1, 2]. Актуальным направлением является поиск перспективных источников противовирусных препаратов [3]. В растениях рода Копеечник накапливаются ксантоновые соединения, в том числе мангиферин (рисунок 1) [4].

При анализе группы ксантонов чаще всего используется хроматоспектрофотометрия, дифференциальная спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, денситометрия [5–11]. Метод капиллярного электрофореза для разделения и количественного определения группы ксантоновых агликонов использовался с буферным раствором натрия тетрабората [12]. В последнее время достаточно часто капиллярный электрофорез используется в сочетании с плазменной масс-спектрометрией (ICPMS). Капиллярный электрофорез (CE) обеспечивает уникальные возможности разделения, такие как высокая эффективность и разрешающая способность, скорость и минимальное использование стандартных образцов. Благодаря развитию интерфейсов с ICPMS, особенно чувствительных и селективных, техника CE стала чаще использоваться при проведении комплексных исследований [13]. Для ксантонов характерными буферными растворами являются боратный [200 mM borate (pH 9.5)] или сульфатный буфер (10 mM sulfated β-CD). Количественное содержание ксантонов определяется по времени миграции ионов [14, 15].

Целью работы является разработка методики количественного определения мангиферина в надземной части видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., собранных на территории Северного Кавказа, методом зонального капиллярного электрофореза [16].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили надземные части следующих видов рода Копеечник:

1. *Hedysarum caucasicum* M.Bieb, Кабардино-Балкария, Джилысу, открытые альпийские луга, фаза цветения, 27–28.07.2017.
2. *Hedysarum grandiflorum* Pall., Волгоградская область, с. Кондраши, фаза цветения, 15.05.2019.
3. *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., Республика Дагестан, Буйнакский район, с. Чиркей, фаза цветения, 10.05.2019.

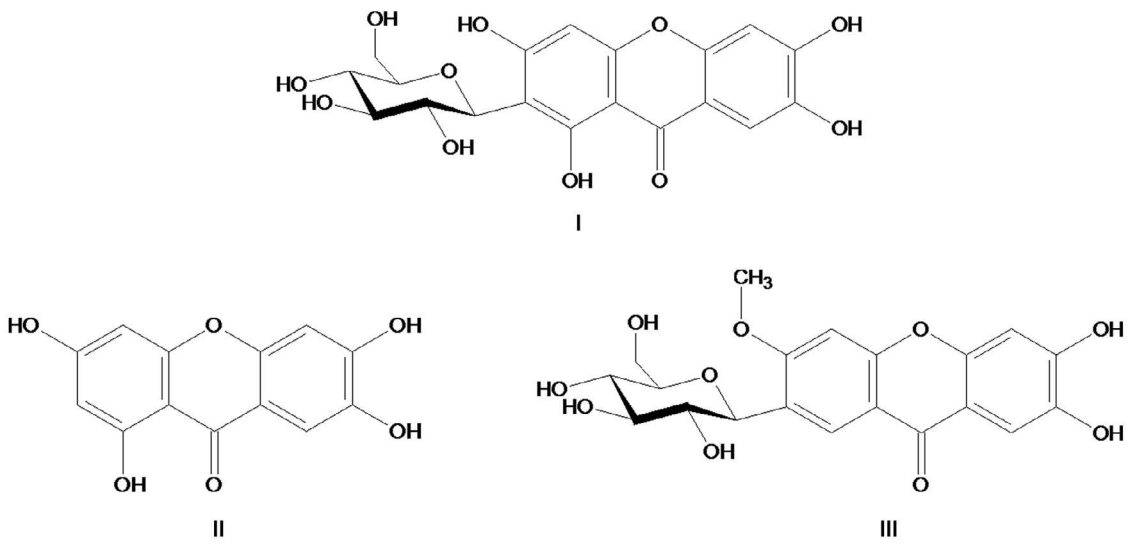


Рисунок 1. **I – мангиферин; II – норатириол; III – гомомангиферин**

Figure 1. **I – mangiferin; II – norathyriol; III – gomomangiferin**

Метод капиллярного электрофореза. Исследование проводили на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105м» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром $L_{эфф.}/L_{общ.}$ = 50/60 см, ID = 75 мкм. Кварцевый капилляр предварительно промывали последовательно водой очищенной, 1 М водными растворами натрия гидроксида и кислоты хлористоводородной. Схема эксперимента данными методами включала анализ стандартного образца мангиферина (субстанция-порошок, содержание мангиферина ≥98 %, Sigma-Aldrich, Lot SLBP4044V), построение калибровочного графика в диапазоне концентраций для КЭ 0,05–0,5 мг/мл и анализ растительных извлечений, расчет количественного содержания мангиферина в траве исследуемых видов.

Построение калибровочного графика СО мангиферина. Точную навеску стандартного образца мангиферина массой около 0,05 г помещали в мерную колбу объемом 100 мл. Добавляли 80 мл 70%-го этилового спирта, после полного растворения стандарта доводили до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А).

Предварительно измеряли оптическую плотность приготовленного раствора на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург, Россия) в диапазоне длин волн 200–500 нм. Для этого аликвоту раствора А объемом 1 мл помещали в две мерные колбы объемом 25 мл. Растворы доводили до метки в одной мерной колбе 70%-м этиловым спиртом и боратным буферным раствором 0,01 М во второй мерной колбе. Растворами сравнения служили 70%-й этиловый спирт в первом случае и 1 мл 70%-го этилового спирта, помещенный в мерную колбу объемом 25 мл и доведенный до метки боратным буферным раствором 0,01 М, – во втором случае.

Наблюдали смещение максимума светопоглощения мангиферина с 365 нм на 383 нм в боратном буферном растворе, что может быть связано с образованием комплекса мангиферина с тетраборатом натрия (рисунок 2).

Для построения градуировочного графика использовали раствор А с концентрациями 0,5 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,05 мг/мл. Для этого 1 мл, 0,7 мл, 0,5 мл, 0,3 мл и 0,1 мл соответственно раствора А помещали в пробирки Эппендорфа объемом 1 мл. Добавляли 0, 0,3, 0,5, 0,7 и 0,9 мл 70%-го этилового спирта. Растворы центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут.

Анализ на капиллярном электрофорезе проводили при напряжении +20 кВ, температуре в капилляре +20 °С, детектирование проводили спектрофотометрически при длине волны 383 нм, время анализа составляло 10 минут. В качестве электролита использовали боратный буферный раствор 0,01 М с pH 9,2 ± 0,02, приготовленный согласно ГОСТ 4919.2-2016 «Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов». Предварительно капилляр промывали последовательно растворами кислоты хлористоводородной 1 М и натрия гидроксида 1 М. Промывку между растворами кислоты и щелочи, а также перед анализом проводили водой очищенной. Промывочные растворы и растворы электролита фильтровали через бумажный фильтр Владипор типа МФАС-Б-4 с диаметром мембраны 25 мм. Буферные растворы, как и испытуемые, центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут. Анализ каждого раствора стандартного образца мангиферина повторяли дважды. Результаты получали, обрабатывали и строили градуировочный график в программе «Эльфоран» (ООО «Люмэкс-маркетинг», Россия, версия 3.2.5) (рисунки 3, 4).

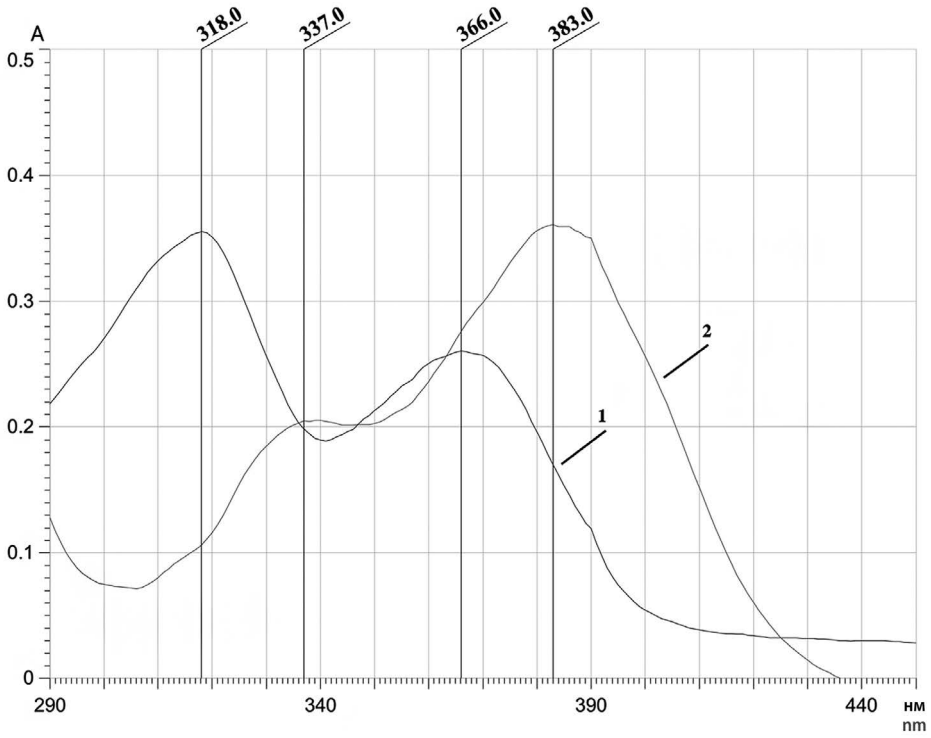


Рисунок 2. **УФ-спектры растворов:**
1 – СО мангиферина (1:2500) в 70%-м спирте этиловом; 2 – СО мангиферина (1:2500) с боратным буферным раствором 0,01 М

Figure 2. **UV spectra of solutions:**
1 – solution mangiferin (1:2500) in 70 % ethyl alcohol; 2 – CO mangiferin (1:2500) with borate buffer solution 0.01 M

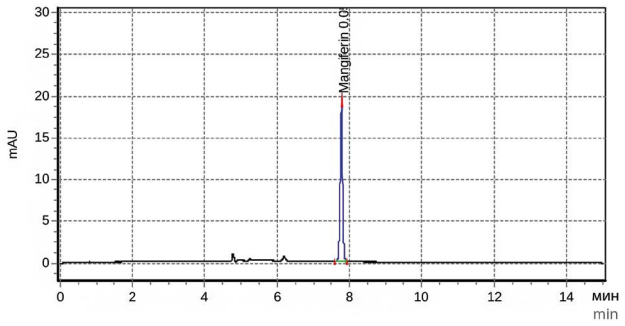


Рисунок 3. **Электрофореграмма СО мангиферина (1:2000)**

Figure 3. **The electrophoregram of the solution of mangiferin standart (1:2000)**

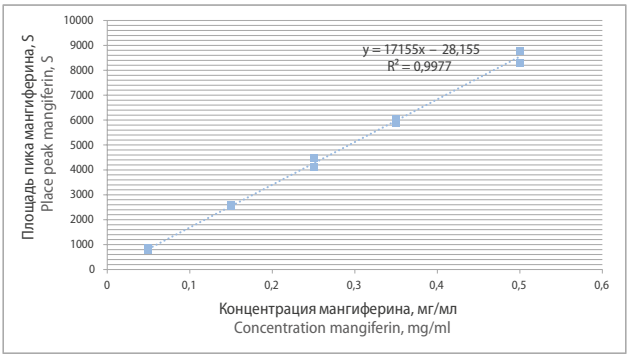


Рисунок 4. **Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации мангиферина в растворе**

Figure 4. **Calibration graphic of the peak area to the concentration of mangiferin in solution**

Пробоподготовку испытуемых растворов из сырья проводили в соответствии с методикой, разработанной нами для определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии для исследуемых видов, которая заключается в следующем.

Точную навеску (около 1,0 г) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом объемом 100 мл, добавляли 40 мл спирта этилового 70 % и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Не снимая холодильник, колбу охлаждали до комнатной температуры в течение 30 мин. Водно-спиртовое извлечение декантировали и фильтровали через вату в колбу для отгонки объемом 250 мл. Экстракцию сырья повторяли 2 раза тем же спиртом порциями по 40 мл, извлечения собирали в ту же колбу. Полученное водно-спиртовое извлечение упаривали на роторном испарителе [Qyre-2A (Qiyu Industrial (Shanghai) Co., Ltd.)] под вакуумом при температуре 80–85 °С до водного остатка объемом около 50 мл, который, не

охлаждая, количественно с помощью 50 мл воды переносили в делительную воронку объемом 250 мл, затем охлаждали до комнатной температуры.

Содержимое делительной воронки обрабатывали хлороформом 3 раза порциями по 30 мл, каждый раз взбалтывали смесь в течение 2 мин (эмульсию и(или) осадок, при наличии, оставляют в делительной воронке). Хлороформные извлечения отбрасывали. Водную фракцию, оставшуюся в делительной воронке, обрабатывали этилацетатом 4 раза порциями по 20 мл, каждый раз взбалтывая смесь в течение 2 мин (эмульсию, при ее образовании, оставляли в делительной воронке). Этилацетатные извлечения последовательно фильтровали через фильтр «красная лента» с 2 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки объемом 250 мл, фильтр ополаскивали 10 мл этилацетата, которые присоединяли к основному фильтрату. Этилацетатное извлечение упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 80–85 °С до полного удаления органического растворителя. Остаток смешивали с 30 мл 70%-го спирта этилового и количественно с помощью того же спирта переносили в мерную колбу объемом 50 мл. Объем раствора доводили до метки спиртом этиловым 70 % и перемешивали. Далее 1 мл полученного раствора центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об/мин и подвергали его анализу.

Содержание в сырье мангиферина (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{1000 \cdot a_x \cdot V_x \cdot (100 - w)},$$

где C – концентрация, мг/мл; a_x – навеска сырья, г; V_x – аликвота, мл; w – влажность сырья, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 5, 6, 7 представлены электрофореграммы извлечений видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., произрастающих на территории Северного Кавказа.

В таблице 1 представлены результаты количественного определения мангиферина в исследуемых видах.

Таблица 1. Содержание мангиферина в траве видов рода *Hedysarum* L. (n = 6; F = 5; $t(P,f)$ = 2,57)

Table 1. The content of the mangiferine in herbs of species *Hedysarum* L. (n = 6; F = 5; $t(P,f)$ = 2,57)

Вид Species	$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	S_x	$S_{\bar{x}}$	$\bar{\varepsilon}$, %
Hedysarum caucasicum M.Bieb.	0,2450,006	0,0061	0,0025	2,59
Hedysarum grandiflorum Pall.	0,1440,006	0,0056	0,0023	4,13
Hedysarum daghestanicum Rupr. ex Boiss.	0,0450,001	0,0013	0,0005	2,93

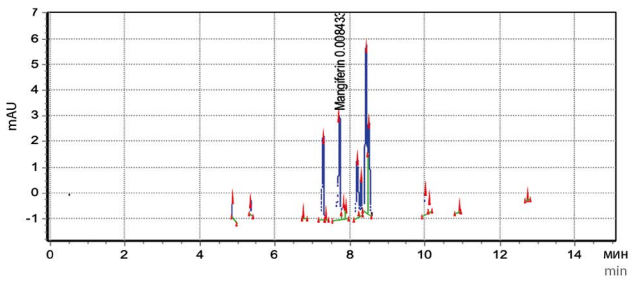


Рисунок 5. Электрофореграмма извлечения *Hedysarum caucasicum* M.Bieb.

Figure 5. The electrophoregram of the extract *Hedysarum caucasicum* M.Bieb.

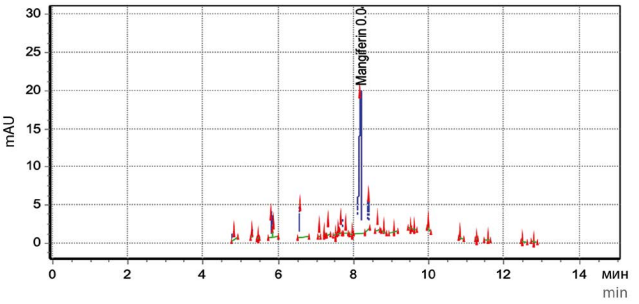


Рисунок 6. Электрофореграмма извлечения *Hedysarum grandiflorum* Pall.

Figure 6. The electrophoregram of the extract *Hedysarum grandiflorum* Pall.

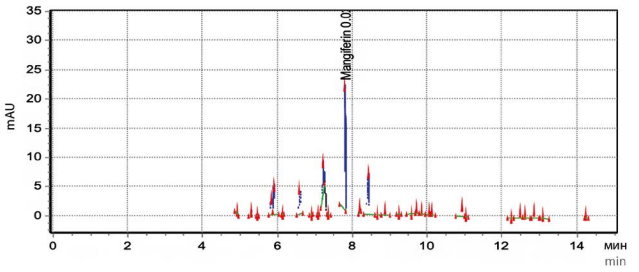


Рисунок 7. Электрофореграмма извлечения *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.

Figure 7. The electrophoregram of the extract *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что наибольшим содержанием мангиферина среди изученных видов рода *Hedysarum* L. отличается *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., что составляет 0,25 % соответственно.

Кроме данного метода количественного определения мангиферина, мы проводили количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии и количественное определение мангиферина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (таблица 2) [17, 18].

Таблица 2. Содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин и мангиферина в траве видов рода *Hedysarum* L.

Table 2. The content of the sum of the xanthones in herbs of species *Hedysarum* L.

Вид Species	Количественное содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин (УФ-спектрофотометрия) The content of the sum of the xanthones (UV-spectrophotometry)	Количественное содержание мангиферина (ВЭЖХ) The content of the mangiferine (HPLC)
Hedysarum caucasicum M.Bieb.	0,620,02	0,0150,003
Hedysarum grandiflorum Pall.	0,600,02	–
Hedysarum daghestanicum Rupr. ex Boiss.	0,560,01	–

Также нами были проведены интродукционные исследования видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН (участок Цудахар). Количественное определение данных интродукционных видов проводилось методом УФ-спектрофотометрии и незначительно отличались от видов, собранных в естественных условиях (таблица 3).

Таблица 3. Содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии в траве видов рода *Hedysarum* L. на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН

Table 3. The content of the sum of the xanthones with UV-spectrophotometry in herbs of species *Hedysarum* L. growing jn the territory of the Mountain Botanical garden

Вид Species	Количественное содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин (УФ-спектрофотометрия) The content of the sum of the xanthones of the mangiferine (UV-spectrophotometry)
Hedysarum caucasicum M.Bieb.	0,61 ± 0,02
Hedysarum grandiflorum Pall.	0,55 ± 0,01
Hedysarum daghestanicum Rupr. ex Boiss.	0,61 ± 0,02

Hedysarum caucasicum M.Bieb. относится к секции *Obscura*, которая, по данным литературы, накапливает значительное количество суммы ксантонов в пересчете на мангиферин [17, 18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности применения метода зонального капиллярного электрофореза при анализе ксантонов, в том числе определения количественного содержания мангиферина, наряду с такими методами, как УФ-спектрофотометрия и ВЭЖХ [17, 18]. Методом УФ-спектрофотометрии возможно только определить содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин, в то время как использование капиллярного электрофореза и ВЭЖХ позволяет определить количественное содержание индивидуальных веществ, в том числе мангиферина, по сравнению со стандартным образцом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Othman S. N. N., Seka M. In-Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of Silver Nanoparticles of Mangiferin Isolated from *Mangifera indica*. *Journal of Global Pharma Technology*. 2019;11(6):10–15.
2. Du, Z., Fanshi F., Lai Y.-H., Chen J.-R., Hao E., Deng J., Hsiao C-D. Mechanism of anti-dementia Effects of Mangiferin in a Senescence Accelerated Mouse (SAMP8) Model. *Bioscience Reports*. 2019;39(9):BSR20190488. DOI: 10.1042/BSR20190488.
3. Исаков В. А., Исаков Д. В., Архипова Е. И., Архипов Г. С. Диагностика и лечение герпетических инфекций. *Вестник НовГУ*. 2019;3(115):31–35. DOI: 10.34680/2076-8052.2019.3(115).31-35.
4. Имачуева Д. Р., Серебряная Ф. К. Современное состояние изученности растений рода копеечник (*Hedysarum* L.) флоры Кавказа. *Фармация и фармакология*. 2016;4(6):4–32. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-6-4-32.
5. Bo T., Liu F., Li K., Liu H. Comparison of Different Capillary Electrophoresis Modes and HPLC for the Separation of Xanthones. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003;26(6):993–1003. DOI: 10.1081/JLC-120018899.
6. Bo T., Liu H. Separation methods for pharmacologically active xanthones. *Journal of Chromatography*. 2004;B812(1-2):165–74. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.009.
7. Bo T., Yang X., Gong S., Li K., Liu H. Quantitative structure-electromigration relationships in the separation of xanthones by cyclodextrin-assisted capillary zone electrophoresis. *Chinese Journal of Chromatography*. 2003;6.
8. Соловьева Е. В., Хоциалова Л. И., Кривут Б. А., Глызин В. И., Майсурадзе Н. И. Содержание мангиферина у видов *Hedysarum* L., выращиваемых в Московской области. *Растительные ресурсы*. 1983;19(3):356–360.
9. Кукушкина Т. А, Зиннер Н. С., Высочина Г. И., Свиридова Т. П. Содержание ксантонов в надземной части растений *Hedysarum theinum* Krasnov. и *H. alpinum* L. (*Fabaceae*) при выращивании в сибирском ботаническом саду (Томск). *Химия растительного сырья*. 2011;3:113–116.
10. Фомина Л. И., Сацыперова И. Ф., Бандюкова В. А. Оптимизация хроматографического разделения мангиферина и гиперозида, выделенных из надземной части *Hedysarum alpinum* L. *Растительные ресурсы*. 1990;25(3):431–437.
11. Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Карнаухова Н. А., Селютина И. Ю. Содержание мангиферина и суммы ксантонов в растениях некоторых дикорастущих и интродуцированных видов *Hedysarum* (*Fabaceae*). *Растительные ресурсы*. 2011;47(1):99–105.
12. Kitanov G. A method for separation of flavonoid and xanthone aglycones with monohydroxyphenyl and o-dihydroxyphenyl moiety. *Acta Pharmaceutica*. 2000;50(1): 69–73.
13. Aupiais J., Chartier F. Capillary electrophoresis. In: *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*. Amsterdam: Elsevier; 2020. 299–356 p. DOI: 10.1016/B978-0-444-59482-2.00006-3.
14. Bo T., Yang X., Gao F., Liu H., Li K.A., Xiu L. Optimized separation of pharmacologically active xanthones fromSecuridaca inappendiculata by capillary electrophoresis. *Chromatographia*. 2002;55(3):217–223. DOI:10.1007/BF02492145.
15. Souza J. R. R., Trevisan M. T. S., Feitosa J. P. A., Ricardo N. M. P. S., Hull W. E., Erben G., Würtele G., Breuer A., Frei E., Ulrich C. M., Owen R. W. Transformation of Mangiferin to Norathyriol by Hu-

man Fecal Matrix in Anaerobic Conditions: Comprehensive NMR of the Xanthone Metabolites, Antioxidant Capacity, and Comparative Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*. 2020;15(3):1–9. DOI: 10.1177/1934578X20910286.
16. Государственная фармакопея Российской Федерации. В 4 томах. XIV изд. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека; 2018. Доступно по: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php.
17. Имачуева Д. Р., Серебряная Ф. К., Зилфикаров И. Н. Количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в надземных органах видов рода копеечник (*Hedysarum* L.) методом УФ-спектрофотометрии. *Химия растительного сырья*. 2020;3:179–186. DOI: 10.14258/jcprm.2020034553.
18. Serebryanaya F. K., Imachuyeva D. R. *Hedysarum* Species from Caucasus. In: Legume Crops – Prospects, Production and Uses. London: IntechOpen; 2020. DOI: 10.5772/intechopen.91741.

REFERENCES

1. Othman S. N. N., Seka M. In-Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of Silver Nanoparticles of Mangiferin Isolated from *Mangifera indica*. *Journal of Global Pharma Technology*. 2019;11(6):10–15.
2. Du, Z., Fanshi F., Lai Y.-H., Chen J.-R., Hao E., Deng J., Hsiao C-D. Mechanism of anti-dementia Effects of Mangiferin in a Senescence Accelerated Mouse (SAMP8) Model. *Bioscience Reports*. 2019;39(9):BSR20190488. DOI: 10.1042/BSR20190488.
3. Isakov V. A., Isakov D. V., Arkhipova E. I., Arkhipov G. S. Diagnostics and treatment of herpesvirus infections. *Vestnik NovGU*. 2019;3(115):31–35. (In Russ.). DOI: 10.34680/2076-8052.2019.3(115).31-35.
4. Imachuyeva D. R., Serebryanaya F. K. The current state of study of plants of *Hedysarum* L. florae of the Caucasus. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*. 2016;4(6):4–32. (In Russ.). DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-6-4-32.
5. Bo T., Liu F., Li K., Liu H. Comparison of Different Capillary Electrophoresis Modes and HPLC for the Separation of Xanthones. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2003;26(6):993–1003. DOI: 10.1081/JLC-120018899.
6. Bo T., Liu H. Separation methods for pharmacologically active xanthones. *Journal of Chromatography*. 2004;B812(1-2):165–74. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.009.
7. Bo T., Yang X., Gong S., Li K., Liu H. Quantitative structure-electromigration relationships in the separation of xanthones by cyclodextrin-assisted capillary zone electrophoresis. *Chinese Journal of Chromatography*. 2003;6.
8. Solovyova E. V., Hotsialova L. I., Krivut B. A., Glyzin V. I., Maysuradze N. I. *Soderzhanie mangiferina u vidov Hedysarum L., vyrashhivaemyh v Moskovskoj oblasti* [Mangiferin content in *Hedysarum* L. species grown in the Moscow region]. *Rastitelnye resursy*. 1983;9(3):356–360. (In Russ.).
9. Kukushkina T. A., Zinner N. S., Vysochina G. I., Sviridova T. P. *Soderzhanie ksantonov v nadzemnoj chasti rastenij Hedysarum theinum Krasnov. i H. alpinum L. (Fabaceae) pri vyrashhivanii v sibirskom botanicheskom sadu (Tomsk)* [Content of xanthones in the aerian part of *Hedysarum theinum* Krasnov plants. and *H. alpinum* L. (*Fabaceae*) growing in the Siberian botanical garden (Tomsk)]. *Khimija rastitel'nogo syr'ja*. 2011;3:113–116. (In Russ.).
10. Fomina L. I., Satsyperova I. F., Bandyukova V. A. *Optimizacija hromatograficheskogo razdelenija mangiferina i giperozida, vydelennyh iz nadzemnoj chasti Hedysarum alpinum L.* [Optimization of chromatographic fractionation of a mangiferin and the hyperoside emitted from an elevated part of *Hedysarum alpinum* L.]. *Rastitelnye resursy*. 1990;25(3):431–437. (In Russ.).
11. Kukushkina T. A., Vysochina G. I., Karnaukhova N. A., Selyutina I. Yu. *Soderzhanie mangiferina i summy ksantonov v rastenijah nekotoryh dikorastushhih i introducirovannyh vidov Hedysarum (Fabaceae)* [Content of mangiferin and total amount of xanthones in plants of some wild-growing and introduced *Hedysarum* (*Fabaceae*) species]. *Rastitelnye resursy*. 2011;47(1):99–105. (In Russ.).
12. Kitanov G. A method for separation of flavonoid and xanthone aglycones with monohydroxyphenyl and o-dihydroxyphenyl moiety. *Acta Pharmaceutica*. 2000;50(1): 69–73.
13. Aupiais J., Chartier F. Capillary electrophoresis. In: *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*. Amsterdam: Elsevier; 2020. 299–356 p. DOI: 10.1016/B978-0-444-59482-2.00006-3.
14. Bo T., Yang X., Gao F., Liu H., Li K.A., Xiu L. Optimized separation of pharmacologically active xanthones fromSecuridaca inappendiculata by capillary electrophoresis. *Chromatographia*. 2002;55(3):217–223. DOI:10.1007/BF02492145.
15. Souza J. R. R., Trevisan M. T. S., Feitosa J. P. A., Ricardo N. M. P. S., Hull W. E., Erben G., Würtele G., Breuer A., Frei E., Ulrich C. M., Owen R. W. Transformation of Mangiferin to Norathyriol by Human Fecal Matrix in Anaerobic Conditions: Comprehensive NMR of the Xanthone Metabolites, Antioxidant Capacity, and Comparative Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. *Natural Product Communications*. 2020;15(3):1–9. DOI: 10.1177/1934578X20910286.
16. *Gosudarstvennaja farmakopeja Rossiïskoj Federacii* [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. In 4 volumes. XIV ed. Moscow: Federal'naja jelektronnaja medicinskaja biblioteka; 2018. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. (In Russ.).
17. Imachuyeva D. R., Serebryanaya F. K., Zilfikarov I. N. *Kolichestvennoe opredelenie summy ksantonov v pereschete na mangiferin v nadzemnyh organah vidov roda kopeechnik (Hedysarum L.) metodom UF-spektrofotometrii* [Quantitative determination of xanthone sum in terms of mangiferin in aerian organs of species of genus *Hedysarum* L. by UF-spectrophotometry]. *Khimija rastitel'nogo syr'ja*. 2020;3:179–186. (In Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020034553.
18. Serebryanaya F. K., Imachuyeva D. R. *Hedysarum* Species from Caucasus. In: Legume Crops – Prospects, Production and Uses. London: IntechOpen; 2020. DOI: 10.5772/intechopen.91741.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105
УДК 615.322

Check for updates

CC BY 4.0

Обзорная статья/Review article

Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор)

А. А. Орлова[1], Й. Стругар[1], О. Ю. Штарк[2], В. А. Жуков[2], В. Г. Лужанин[1], М. Н. Повыдыш[1]*

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А
2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ), 196608, Россия, г. Санкт-Петербург, Пушкин-8, шоссе Подбельского, д. 3

***Контактное лицо:** Повыдыш Мария Николаевна. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: А. А. Орлова – https://orcid.org/0000-0002-7836-5785; Й. Стругар – https://orcid.org/0000-0002-0816-2579; О. Ю. Штарк – https://orcid.org/000-0002-3656-4559; В. А. Жуков – https://orcid.org/0000-0002-2411-9191; В. Г. Лужанин – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; М. Н. Повыдыш – https://orcid.org/0000-0002-7768-9059.

Статья поступила: 25.12.2020. **Статья принята в печать:** 03.02.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Целью аналитического обзора является обобщение данных современной научной литературы о направлениях и возможностях использования подходов метаболомики в анализе лекарственных растений, растительного сырья и фитопрепаратов.
Текст. Анализ литературных данных показал, что метаболомные подходы имеют большой потенциал в области контроля качества многокомпонентных фитопрепаратов и биологически активных добавок (БАД), выявления фальсификаций редкого и дорогостоящего растительного сырья, хемосистематики лекарственных растений, изучения механизмов действия и токсичности лекарственных растений и т. д.
Заключение. Метаболомный анализ может стать эффективной аналитической платформой как для фитохимического исследования растительного сырья, так и для регулярных мероприятий по контролю качества растительного материала и фитопрепаратов.

Ключевые слова: метаболомика, фитопрепараты, лекарственные растения, контроль качества, фитохимия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. А. А. Орлова, Й. Стругар, М. Н. Повыдыш сделали подбор материалов, подготовку текста статьи. О. Ю. Штарк, В. А. Жуков, В. Г. Лужанин обсуждали результаты, редактировали текст статьи.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-16-00107.

Для цитирования: Орлова А. А., Стругар Й., Штарк О. Ю., Жуков В. А., Лужанин В. Г., Повыдыш М. Н. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):97–105. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105

Use of Metabolomic Approaches in Analysis of Medicinal Plants and Phytopreparations (Review)

Anastasiia A. Orlova[1], Jovana Strugar[1], Oksana Yu. Shtark[2], Vladimir A. Zhukov[2], Vladimir G. Luzhanin[1], Maria N. Povydysh[1]*

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia
2 – Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology RAS», 3, Podbelsky chausse, Pushkin 8, Saint-Petersburg, 196608, Russia

***Corresponding author:** Maria N. Povydysh. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: Anastasiia A. Orlova – https://orcid.org/0000-0002-7836-5785; Jovana Strugar – https://orcid.org/0000-0002-0816-2579; Oksana Yu. Shtark – https://orcid.org/000-0002-3656-4559; Vladimir A. Zhukov – https://orcid.org/0000-0002-2411-9191; Vladimir G. Luzhanin – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027; Maria N. Povydysh – https://orcid.org/0000-0002-7768-9059.

Received: 25.12.2020. **Revised:** 03.02.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. The purpose of the analytical review is to summarize the data of modern scientific literature on the directions and possibilities of using the approaches of metabolomics in the analysis of medicinal plants, plant raw materials and herbal drugs.
Text. Analysis of literature data showed that metabolomic approaches have great potential in the field of quality control of multicomponent phytopreparations and biologically active additives, detection of falsifications of rare and expensive plant materials, chemosystematics of medicinal plants, study of the mechanisms of action and toxicity of medicinal plants, etc.
Conclusion. Metabolic analysis can become an effective analytical platform both for phytochemical research of plant raw materials and for regular activities to control the quality of plant material and phytopreparations.

Keywords: metabolomics, phytopreparations, medicinal plants, quality control, phytochemistry.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Anastasiia A. Orlova, Jovana Strugar, Maria N. Povydysh – selection of materials, preparation of the text of the article; Oksana Yu. Shtark, Vladimir A. Zhukov, Vladimir G. Luzhanin – discussion of the results, editing the text of the article.

Acknowledgment. This work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant No. 20-16-00107.

For citation: Orlova A. A., Strugar J., Shtark O. Yu., Zhukov V. A., Luzhanin V. G., Povydysh M. N. Use of metabolomic approaches in analysis of medicinal plants and phytopreparations. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):97–105. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-97-105

© Орлова А. А., Стругар Й., Штарк О. Ю., Жуков В. А., Лужанин В. Г., Повыдыш М. Н., 2021
© Orlova A. A., Strugar J., Shtark O. Yu., Zhukov V. A., Luzhanin V. G., Povydysh M. N., 2021

ВВЕДЕНИЕ

Понятие «метаболом» было впервые предложено в 1998 году Стивеном Оливером для обозначения всех низкомолекулярных соединений, синтезируемых организмом [1]. Метаболом растений является совокупностью всех первичных и вторичных метаболитов и может рассматриваться как результат реализации генетической информации, «связующее звено» между генотипом и фенотипом [2, 3]. В 2002 году Оливер Фиен ввел понятие «метаболомика» для обозначения всеобъемлющего анализа, включающего идентификацию и количественную оценку всех метаболитов организма [4].

Метаболомика растений обычно определяется как тотальный качественный и количественный анализ метаболитов, содержащихся в биологической системе в определенных условиях [5]. Методологию метаболомики можно условно разделить на целевую или таргетную (targeted metabolomics), и нецелевую или нетаргетную (untargeted metabolomics). Первая предполагает целевой поиск и, как правило, количественный анализ ограниченного числа заведомо известных веществ. *Нецелевая метаболомика* – это исчерпывающий анализ всех измеряемых метаболитов, в том числе неизвестных [6–8].

Ниже перечислены основные подходы, связанные с исследованиями метаболома:

1. *Метабономика* (от греч. *«мета»* – изменение, и *«номос»* – набор правил или закономерностей) – обычно используется для исследования нерастительных организмов и подразумевает количественное определение эндогенных метаболитов, содержание которых динамически изменяется в живой системе в ответ на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию. Для данного анализа обычно используют ткани и биологические жидкости. Может применяться для выявления механизмов действия растительных препаратов [9–11].
2. *Профилирование метаболитов.* Идентификация и количественная оценка комплекса метаболитов, связанных общим метаболическим путем или сходством химической структуры. Профиль метаболитов можно определить как набор всех метаболитов и/или их производных (идентифицированных или неизвестных), обнаруживаемых с помощью определенного метода анализа [12, 13].
3. *«Штрихкодирование» (Fingerprinting).* Быстрый и высокопроизводительный метод, направленный на получение профиля метаболитов в суммарных экстрактах. Обычно при использовании данного подхода метаболиты не идентифицируют и не определяют количественно [5, 14].
4. *Целевой анализ метаболитов.* Качественный и количественный анализ одного или нескольких заранее определенных метаболитов, связанных с конкретной метаболической реакцией. Такой подход основан на оптимизированном извлечении, разделении и обнаружении метаболитов [15, 16].

Современная англоязычная научная литература насчитывает десятки обзоров, посвященных как общим вопросам метаболомики растений [17–20], так и частным случаям ее применения в анализе лекарственных растений [21–24]. Быстро развивающееся направление нашло отражение и в ряде практических руководств и протоколов [25–28]. К сожалению, подобные статьи на русском языке очень немногочисленны [29–32].

Целью данного аналитического обзора является обобщение данных современной научной литературы о возможностях использования подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специалисты в области метаболомики во всем мире подчеркивают необходимость того, чтобы все этапы метаболомных исследований были стандартизированы, что позволит производить корректное сравнение данных, а также создать общедоступную базу данных, которая в сочетании с протеомными и транскриптомными базами данных будет использоваться в функциональной геномике и системной биологии [33–37]. В общем виде схема метаболомного анализа растений включает:

1. Пробоподготовку (заготовка растительного сырья, сушка, экстракция, дериватизация, очистка).
2. Анализ проб, основанный на различных видах масс-спектрометрии (ГЖХ-МС, ВЭЖХ-МС) или ЯМР-спектроскопии.
3. Обработку полученных результатов (нормализация данных, масштабирование, статистическое моделирование, идентификация хроматографических пиков).
4. Интерпретацию результатов.
5. В системной биологии далее следует формулирование гипотезы и ее экспериментальная проверка.

На сегодняшний день существует тенденция к созданию обобщенных протоколов для наиболее распространенных аналитических методов. Так, были формализованы протоколы метаболомики на основе ГХ-МС [38], на основе ВЭЖХ-МС [39], на основе ЯМР [19, 21] и некоторые другие [40, 41]. За последнее десятилетие был издан ряд практических руководств и обзоров, имеющих целью стандартизацию ключевых шагов в исследованиях метаболизма растений [25, 26, 42, 43]. Стадии пробоподготовки при работе с растительными объектами детально изложены в работе H. K. Kim и R. Verpoorte (2010). Описывается влияние на результат исследований таких факторов, как время заготовки, выбор органа растения, особенности сушки растительного сырья и т. д. [44].

Ключевой проблемой современной метаболомики является работа с огромным количеством разрозненных данных [45, 46]. Существует ряд обзоров, описывающих существующие электронные базы данных для метаболомики растений, включая базы масс-

спектров для различных групп метаболитов, базы структур и химических характеристик природных соединений, базы данных о метаболических путях растений, базы данных компонентов растений традиционной медицины [47–49]. Перечень наиболее распространенных баз данных представлен на рисунке 1.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛОМИКИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Анализ многокомпонентных фитопрепаратов и БАД

Для стандартизации и контроля качества многокомпонентных извлечений из растительного сырья и препаратов с успехом используются метаболомные подходы, основанные главным образом на масс-спектрометрии и ^{1}H ЯМР [50, 51].

Так, с использованием методов ВЭЖХ-МС и ЯМР с последующей статистической обработкой методом главных компонент проведена сравнительная оценка состава метаболитов *Artemisia afra и A. annua* и пищевой добавки «Artemisia», которая, по описанию производителя, создана на основе экстракта *A. afra* и обладает противомалярийным эффектом, связанным с высоким содержанием артемизина. В результате анализа следов артемизинина в пробе *A. afra*, а также в растительном материале капсул обнаружено не было. Таким образом, данный метод может использоваться в качестве надежного метода контроля качества биологически активных добавок растительного происхождения и выявления фальсификатов [52]. Контроль качества традиционных и аюрведических препаратов также является значительной проблемой в современной фармации, так как химический состав этих многокомпонентных средств не всегда известен полностью. Метаболическое профилирование таких составов и изучение методов их стандартизации помогает получить убедительные научные доказательства и повысить их признание научным сообществом и потребителями [53, 17].

Выявление фальсификаций

В случае наличия в составе препарата редких или дорогостоящих видов сырья часто имеет место фальсификация, выявление которой в процессе контроля качества является важной задачей. Метаболическое профилирование с использованием многомерного анализа ^{1}H ЯМР-спектров позволяет идентифицировать близкие виды и распознать нежелательные примеси. Так, была показана возможность отличать ядовитую кору *Strychnos nux-vomica* (так называемой «ложной ангостуры») от коры тропического дере-

Базы данных масс-спектров Mass Spectrum Databases	**Базы структур и химических характеристик природных соединений** Bases of structures and chemical characteristics of natural compounds	**Данные о метаболических путях растений** Plant metabolic pathway	**Данные анализа метаболических профилей растений** Analysis data of metabolic profiles of plants
MassBank - http://www.massbank.jp/	Chemical Abstract Service (CAS) - http://www.cas.org/	KEGG - https://www.genome.jp /kegg/pathway.html	PlantMetabolomics.org - http://www.plantmetabolomics.org
NIST - http://www.sisweb.com /software /ms/nist.htm	PubChem database in NCBI - http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	UniPathway - http://www.unipathway.org/	Medicinal Plant Metabolomics Resource - http://metnetdb.org /mpmr_public/
Golm Metabolome Database (GMD) - http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Default.aspx	ChemSpider - http://www.chemspider.com/	SMPDB - http://www.smpdb.ca	MeKO database - http://prime.psc.riken.jp/meko/
Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) - http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs /cgi-bin/cre_index.cgi?langDeng	KEGG compound - http://www.genome.jp/kegg /compound/	iPath - http://pathways.embl.de	KOMICMarket - http://webs2.kazusa.or.jp/komics/
MassBase - http://webs2.kazusa.or.jp /massbase/	Plant Metabolome Database (PMDB) - http://www.sastra.edu /scbt/pmdb/	PlantCyc - http://www.plantcyc.org/	McGill MetabolomeDatabase - http://metabolomics.mcgill.ca/
MetabolomeExpress and MetaboLights - https://www.metabolome-express.org/	Manchester Metabolomics Database (MMD) - http://dbkgroup.org/MMD/	BioCyc - http://biocyc.org/	
METLIN - http://metlin.scripps.edu			

Рисунок 1. Ресурсы, наиболее востребованные в метаболомных исследованиях растений

Figure 1. The most useful resources in plant metabolomics research

ва ангостура (*Angostura trifoliata*), применяемой в качестве тонизирующего средства или вкусовой добавки горьких спиртных напитков. Диагностическими соединениями оказались бруцин, логанин и жирные кислоты [54].

Показано, что использование ^{1}H ЯМР-спектроскопии без предварительного разделения метаболитов в сочетании с многомерным статистическим анализом позволяет эффективно различать образцы *Echinacea* (*E. purpurea, E. pallida* и *E. angustifolia)*, которые нередко подвергаются подмене на европейском фармацевтическом рынке [55].

Хемосистематика лекарственных растений

Для видовой идентификации растений и построения ботанических систем применяются таргетный и нетаргетный подходы к профайлинговому исследованию метаболитов [56, 57]. Для распознавания близких видов рода *Panax* был проведен нетаргетный скрининг вторичных метаболитов методом высокоэффективной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Были определены три биомаркера – чикусетсусапонин IVa, гинзенозид Rf и гинзенозид Rc, как наиболее специфичные биомаркеры для *Panax ginseng* [58]. С использованием таргетного метаболомного анализа методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии изучена вариабельность 10 маркерных фенольных соединений и иридоидов (непеталактонов) в 12 видах рода *Nepeta*. В случае лекарственных растений выявление хемомаркеров имеет практическую значимость и может использоваться для отличия друг от друга морфологически сходных близких видов [59].

Изучение механизмов токсичности и биологической активности лекарственных растений

Установление механизмов токсического действия природных соединений помогает определить безопасные пути их использования в медицинской практике [60]. Zhang et al. (2006) использовали методы метаболомики для исследования токсичности аристолохиевой кислоты, содержащейся в растениях рода *Aristolochia*. Анализ биохимических показателей мочи крыс методом ^{1}H ЯМР после введения аристолохиевой кислоты и нескольких токсинов с известными механизмами действия позволил выявить поражение проксимальных канальцев и папиллярных узлов мочевыделительной системы, легкое поражение печени при воздействии на организм аристолохиевой кислоты, а также ее накопительное действие. Эти результаты были подтверждены общепринятыми клиническими биохимическими методами [61].

В последние годы был проведен ряд исследований по изучению путей метаболизма растительных экстрактов и их основных компонентов в организме в экспериментах *in vivo*. Подходы протеомики и метаболомики являются эффективными стратегиями для понимания механизмов воздействия лекарственных средств на возбудителей инфекционных заболеваний [62]. Так, в целях поиска новых лекарств для борьбы с инфекцией, вызванной *Mycobacterium tuberculosis*, определяли метаболический профиль культуры *M. tuberculosis* после обработки экстрактами лекарственных растений и без нее. Метаболиты, которые различаются у обработанных и необработанных культур, позволяют выявить мишени и механизмы воздействия природных соединений [56].

Поиск растений – источников перспективных метаболитов. «Обратная» фармакогнозия

Новый подход к поиску источников перспективных природных соединений был назван «обратной фармакогнозией» («reverse pharmacognosy»). Классическая фармакогнозия использует растения для обнаружения в их составе новых биологически активных соединений, тогда как обратная фармакогнозия использует данные о природных соединениях для поиска новых свойств лекарственных растений [63]. Целью обратной фармакогнозии является поиск новых биологических мишеней для природных соединений путем виртуального или реального скрининга и выявления природных ресурсов, содержащих активные молекулы [64]. Такой подход использует богатые знания этнофармакологии наряду с современными техническими возможностями, включающими метаболомику и методы *in silico*. Для эффективного применения данного подхода необходимо располагать базами данных структур природных соединений, биологических мишеней, этнофармакологических знаний и ресурсами для виртуального скрининга [49].

Фармацевтическая промышленность испытывает недостаток лекарств-кандидатов, и репозиционирование лекарств, т. е. установление новых видов применения для существующих лекарств, в области фитопрепаратов может быть с успехом осуществлено путем комбинации подходов прямой и обратной фармакогнозии [65]. Поскольку большинство природных соединений проявляют плейотропные (множественные) эффекты при взаимодействии с различными мишенями, вычислительные методы являются незаменимыми в поиске новых лекарств природного происхождения. На примере изучения плейотропных терапевтических эффектов 50 лекарственных растений традиционной индийской медицины была показана эффективность применения компьютерных программ PASS и PharmaExpert для анализа спектров биологической активности фитокомпонентов как по отдельности, так и в комбинациях. Применение подходов *in silico*, в том числе виртуального скрининга, позволило выявить новые мишени для исследуемых природных молекул, выходящие за пределы традиционного использования соответствующих лекарственных растений [66, 67].

Направленное изменение синтеза вторичных метаболитов

Установлено, что взаимодействие с другими организмами оказывает непосредственное влияние на биохимические реакции растения: реакции защиты организма от патогена или паразита или же сигнальные каскады, направленные на взаимовыгодные отношения с симбионтом [68]. H. C. Choi и др. (2006) в качестве модели исследования использовали листья табака, зараженные вирусом табачной мозаики, и выявили, что заражение приводит к увеличению содержания фенилпропаноидов, участвующих в укреплении клеточной стенки, а также кофеоилхинной кислоты, вовлеченной в защитные реакции организма [69]. Арбускулярная микориза является взаимовыгодным симбиозом растений с грибами *Glomeromycota*, развивающимся в корнях растений. Показано, что микоризованные растения производят большее количество терапенвтически ценных соединений, таких как фитоэстрогены, алкалоиды, фуранокумарины и птерокарпаны, а также антиоксидантов и эссенциальных масел [70]. Под влиянием микоризации в листьях гороха (*Pisum sativum* L.) на поздних стадиях развития растений были затронуты пути биосинтеза монобактама и стероидов и метаболизма порфирина и хлорофиллов. Микоризация вызывала некоторое запаздывание изменений метаболома листьев, связанных с увеличением возраста растения [71].

Подходы метаболомики могут оказаться полезными также в процессе создания новых генетических линий с увеличенной продукцией целевых компонентов. Так, были получены *in vitro* 26 зародышевых линий *Scutellaria baicalensis* с различными фитохимическими профилями. Экстракты полученных образцов содержали более 2000 соединений. Нецелевой метаболомный подход был использован для установления корреляции между химическим составом и лекарственным потенциалом. В результате исследования были предложены критерии отбора наиболее перспективных линий на основании антиоксидантного потенциала, скорости роста, содержания байкалина, мелатонина и вогонина [72].

Производство лекарственных препаратов из клеточных культур растений имеет ряд преимуществ, связанных с возможностью использования различных биотических и абиотических элиситоров и лучшим контролем процессов накопления биологически активных веществ. Методом ВЭЖХ-МС и ЯМР-спектроскопии были идентифицированы вторичные метаболиты в культурах клеток *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* и *Dioscorea deltoidea*. Прогнозирование спектров биологической активности данных соединений с помощью программы PASS показало перспективы экспериментального также механизмы действия, связанные с проявлением антигипоксического эффекта, для каждого из соединений. Программное обеспечение PharmaExpert позволило проанализировать возможные синергетические или аддитивные эффекты комбинаций метаболитов, связанные с данным видом активности. Прогноз *in silico* был подтвержден в экспериментальных исследованиях антигипоксического действия экстрактов на животных [73].

Влияние условий заготовки на метаболомный профиль

Известно, что проявление сезонной вариабельности в качественном и количественном составе вторичных метаболитов может отразиться на качестве сырья, используемого для производства фитопрепаратов и БАД. Исследования профилей вторичных метаболитов могут применяться для изучения изменчивости химического состава в зависимости от времени заготовки, условий сушки и первичной обработки и морфологической группы растительного сырья. Scognamiglio et al. (2014) продемонстрировали сезонные изменения состава метаболитов в извлечениях из листьев *Phillyrea angustifolia*, собранных с апреля по март, с использованием метода ^{1}H ЯМР-профилирования и многомерного анализа данных. В ходе данного исследования были установлены количественные изменения содержания иридоидов в течение года, а также различная выраженность фитотоксичности в отношении тестового растения *Triticum ovatum* [74].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор литературы показал, что использование метаболомики при работе с растительными объектами представляется удобным и эффективным инструментом для выявления фармакологически активных молекул, а также для решения целого ряда теоретических и прикладных проблем. Однако нельзя не отметить, что результаты подобных исследований по-прежнему трудно сопоставимы из-за большой вариабельности методологических и технических подходов к их проведению. Исходя из этого, актуальным развитием данного направления представляется разработка стандартных унифицированных процедур анализа и создание комплексных баз данных для развития информативной метаболомики.

На сегодняшний день использование метаболомики при работе с лекарственными растениями в большинстве случаев ограничивается проведением метаболомного профилирования для выявления новых природных соединений. Анализ литературных данных показал, что метаболомные подходы также имеют огромный потенциал в рутинном и экспресс-анализе фитопрепаратов и биологически активных добавок, выявлении фальсификаций редких и дорогостоящих видов растительного сырья, хемосистематике, изучении механизмов действия и токсичности лекарственных растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. 1998;16(9):373–378. DOI:10.1016/S0167-7799(98)01214-1.
2. Sumner L. W., Mendes P., Dixon R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 2003;62(6):817–836.
3. Li Y., Li K., Zhang X. Next generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*. 2017;8:115774–115786. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.22404.
4. Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 2002;48:155–171. DOI: 10.1023/A:1013713905833.
5. Tugizimana F., Piater L., Dubery I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*. 2013;109(5-6):1–11.
6. Гончаров Н. В., Уколов А. И., Орлова Т. И., Мигаловская Е. Д., Войтенко Н. Г. Метаболомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. *Успехи современной биологии*. 2015;135(1):3–17.
7. Bingol K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. *High-throughput*. 2018;7(9):1–11. DOI: https://doi.org/10.3390/ht7020009.
8. Gorrochategui E., Jaumot J., Lacorte S., Tauler R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016;82:425–442.
9. Ott K. H., Araníbar N., Singh B., Stockton G. W. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry*. 2003;62(6):971–985.
10. Yang J., Song S. L., Castro-Perez J., Plumb R. S., Xu G. W. Metabonomics and its Applications. *Chinese journal of biotechnology*. 2005;21(1):1–5.
11. Lindon J. C., Holmes E., Nicholson J. K. Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharmaceutical Researches*. 2006;23:1075–1088. DOI: 10.1007/s11095-006-0025-z.
12. Wolfender J. L., Marti G., Thomas A., Bertrand S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*. 2015;1382:136–164.
13. Sung J., Lee S., Lee Y., Ha S., Song B., Kim T., Waters B. W., Krishnan H. B. Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science*. 2015;241:55–64. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.09.027.
14. Kim H. K., Choi Y. H., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolic Fingerprinting of Ephedra Species Using 1H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2005;53(1):105–109. DOI: 10.1248/cpb.53.105.
15. Shimizu T., Watanabe M., Fernie A. R., Tohge T. Targeted LC-MS analysis for plant secondary metabolites. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2018;1778:171–181. DOI: 10.1007/978-1-4939-7819-9_12.
16. Sawada Y., Akiyama K., Sakata A., Kuwahara A., Otsuki H., Sakurai T., Saito K., Hirai M. Y. Widely Targeted Metabolomics Based on Large-Scale MS/MS Data for Elucidating Metabolite Accumulation Patterns in Plants. *Plant and Cell Physiology*. 2008;50(1):37–47. DOI: 10.1093/pcp/pcn183.
17. Okada T., Afendi F.M., Altaf-Ul-Amin M., Takahashi H., Nakamura K., Kanaya S. Metabolomics of Medicinal Plants: The Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. *Current Computer Aided-Drug Design*. 2010;6(3):179–196. DOI: 10.2174/157340910791760055.
18. Cevallos-Cevallos J. M., Reyes-De-Corcuera J. I., Etxeberria E., Danyluk M. D., Rodrick G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20(11-12):557–566. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.07.002.
19. Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*. 2010;5(3):536–549. DOI: 10.1038/nprot.2009.237.
20. Kim H. K., Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(1):4–13. DOI: 10.1002/pca.1188.
21. Kruger N. J., Troncoso-Ponce M. A., Ratcliffe R. G. 1H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1001–1012. DOI: 10.1038/nprot.2008.64.
22. Nair P., Kandasamy S., Zhang J., Ji X., Kirby C., Benkel B., Prithiviraj B. Transcriptional and metabolomic analysis of Ascophyllum nodosum mediated freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics*. 2012;13(1:643):1–23. DOI: 10.1186/1471-2164-13-643.
23. Angelcheva L., Mishra Y., Antti H., Kjellsen T. D., Funk C., Strimbeck R. G., Schröder W. P. Metabolomic analysis of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *New Phytologist*. 2014;204(3):545–555. DOI: 10.1111/nph.12950.
24. Arora R., Malhotra, P., Mathur A. K., Mathur A., Govil C. M., Ahuja P. S. Anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*: transition from traditional to modern medicine. Herbal Medicine: A Cancer Chemopreventive and Therapeutic Perspective. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Ltd; 2010. 292–310 p.
25. Weckwerth W., Kahl G. The handbook of plant metabolomics. Weinheim: John Wiley & Son; 2013. 424 p.
26. Putri S. P., Fukusaki E. Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide. Boca Raton: CRC Press; 2014. 294 p.
27. António C. Plant metabolomics: Methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2018. 355 p.
28. Wehrens R., Salek R. Metabolomics: practical guide to design and analysis. Boca Raton: CRC Press; 2018. 290 p.
29. Прокопьев И. А., Порядина Л. Н., Конорева Л. А., Шаварда А. Л., Филиппова Г. В. Метаболомный профайлинг некоторых видов рода *Cladonia* (*Cladoniaceae*). *Растительные ресурсы*. 2018;54(1):98–105.
30. Лоскутов И. Г., Шеленга Т. В., Конарев А. В., Шаварда А. Л., Блинова Е. В., Дзюбенко Н. И. Метаболомный подход к сравнительному анализу диких и культурных видов овса (*Avena* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):636–642.
31. Пузанский Р. К., Емельянов В. В., Гавриленко Т. А., Шишова М. Ф. Перспективы метаболомных исследований растений картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):112–123.
32. Куркин В. А. Метаболомика растений как методологическая основа стандартизации лекарственных растительных препаратов. Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке»; 28 ноября, 2018. Москва: Российский университет дружбы народов. С. 107–109.
33. Peterson E. S., McCue L. A., Schrimpe-Rutledge A. C., Jensen J. L., Walker H., Kobold M. A., Webb S. R., Payne S. H., Ansong Ch., Adkins J. N., Cannon W. R., Webb-Robertson B.-J. M. VESPA: software to facilitate genomic annotation of prokaryotic organisms through integration of proteomic and transcriptomic data. *BMC Genomics*. 2012;13(1:131):1–12. DOI: 10.1186/1471-2164-13-131.
34. Kumar D., Bansal G., Narang A., Basak T., Abbas T., Dash D. Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *PROTEOMICS*. 2016;16(19)2533–2544. DOI: 10.1002/pmic.201600140.
35. Gan H., Cai T., Lin X., Wu Y., Wang X., Yang F., Han C. Integrative Proteomic and Transcriptomic Analyses Reveal Multiple Post-transcriptional Regulatory Mechanisms of Mouse Spermatogenesi. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(5):1144–1157. DOI: 10.1074/mcp.m112.020123.
36. Xia J., Wishart D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016;55(1):1–91. DOI: 10.1002/cpbi.11.
37. Чередниченко М. Ю., Доброногова А. С., Поливанова О. Б., Хлебникова Д. А., Сосина А. В. Фундаментальные и прикладные аспекты использования системной биологии. *Естественные и технические науки*. 2020;2(140):47–54.
38. Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A. R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. 2006;1:387–396. DOI: 10.1038/nprot.2006.59.
39. De Vos R., Moco S., Lommen A., Keurentjes J. J. B., Bino R. J., Hall R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2007;2:778–791. DOI: 10.1038/nprot.2007.95.

40. Sawada Y., Hirai M. Y. Integrated LC-MS/MS system for plant metabolomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2013;4(5):1–6. DOI: 10.5936/csbj.201301011.
41. Hendriks M. M.W.B., Cruz-Juarez L., De Bont D., Hall R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Analytica Chimica Acta*. 2005;545(1):53–64. DOI: 10.1016/j.aca.2005.04.026.
42. Sumner L. W., Huhman D. V., Urbanczyk-Wochniak E., Lei Z. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: Secondary metabolism. *Plant Systems Biology. Experientia Supplementum*. 2007:97:195–212. DOI: 10.1007/978-3-7643-7439-6_9.
43. Hardy N. W., Hall R. D. Plant metabolomics: methods and protocols. *Humana Press*. 2012;860:1–10.
44. Kim H. K., Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2010;21(1):4–13.
45. Доброногова А. С., Чередниченко М. Ю. Синтез вторичных метаболитов в биоонтологиях. Актуальные проблемы ботаники и охраны природы. 28–30 ноября. 2017; Симферополь. С. 146–152.
46. Мильман Б. Л., Журкович И. К. Избранная статистика использования библиотек масс-спектров. *Масс-спектрометрия*. 2014;11(2):123–125.
47. Fukushima A., Kusano M. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. *Frontiers in plant science*. 2013;4:1–39. DOI: 10.3389/fpls.2013.00073.
48. Sorokina M., Steinbeck, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*. 2020;12:1–51.
49. Nguyen-Vo T. H., Nguyen L., Do N., Nguyen T. N., Trinh K., Cao H., Le L. T. Plant Metabolite Databases: From Herbal Medicines to Modern Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2020;60(3):1101–1110. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00826.
50. Mattoli L., Cangi F., Maidecchi A., Ghiara C., Ragazzi E., Tubaro M., Stella L., Tisato F., Traldi P. Metabolomic fingerprinting of plant extracts. *Journal of Mass Spectrometry*. 2006;41(12):1534–1545. DOI: 10.1002/jms.1099.
51. Wolfendera J.-L., Glausera G., Boccardb J., Rudazb S. MS-based Plant Metabolomic Approaches for Biomarker Discovery. *Natural Product Communications*. 2009;4(10):1417–1430. DOI: 10.1177/1934578X0900401019.
52. Van der Kooy F., Verpoorte R., Meyer J.J.M. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. *South African Journal of Botany*. 2008;74(2):186–189. DOI: 10.1016/j.sajb.2007.10.004.
53. Mukherjee P. K., Harwansh R. K., Bshsdur S., Biswas S., Kuchibhatia L. N., Tetali S. D., Raghavendra A. S. Metabolomics of medicinal plants–a versatile tool for standardization of herbal products and quality evaluation of ayurvedic formulations. *Current Science*. 2016;111(10):1624–1630.
54. Frédérich M., Choi Y. H., Angenot L., Harnischfeger G., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolomic analysis of Strychnos nux-vomica, Strychnos icaja and Strychnos ignatii extracts by 1H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques. *Phytochemistry*. 2004;65(13):1993–2001.
55. Frédérich M., Jansen C., de Tullio P., Tits M., Demoulin V., Angenot L. Metabolomic analysis of *Echinacea spp*. by 1H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate data analysis technique. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(1):61–65. DOI: 10.1002/pca.1156.
56. Tuyiringire N., Tusubira D., Munyampundu J.-P., Tolo C. U., Muvunyi C. M., Ogwang P. E. Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity. *Clinical and translational medicine*. 2018;7(29):1–12. DOI: 10.1186/s40169-018-0208-3.
57. Чадин И. Хемосистематика – основа изучения биохимического разнообразия растений. *Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН*. 2001;46:23–25.
58. Wang H. P., Liu Y., Chen C., Xiao H. B. Screening specific biomarkers of herbs using a metabolomics approach: a case study of *Panax ginseng*. *Scientific reports*. 2017;7(1):1–9.
59. Mišić D., Šiler B., Gašić U., Avramov S., Živković S., Nestorović Živković J., Milutinović M., Tešić Ž. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/–) HESI-MS/MS Analysis of Phenolic Acids and Nepetalactones in Methanol Extracts of *Nepeta* Species: A Possible Application in Chemotaxonomic Studies. *Phytochemical Analysis*. 2015;26(1):72–85. DOI: 10.1002/pca.2538.
60. Sun B., Wu S., Li L., Li H., Zhang Q., Chen H., Li F., Dong F., Yan X. A metabolomic analysis of the toxicity of Aconitum sp. alkaloids in rats using gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009;23(8):1221–1228. DOI: 10.1002/rcm.3992.
61. Zhang X., Wu H., Liao P., Li X., Ni J., Pei F. NMR-based metabonomic study on the subacute toxicity of aristolochic acid in rats. *Food and chemical toxicology*. 2006;44(7):1006–1014. DOI: 10.1016/j.fct.2005.12.004.
62. Mumtaz M. W., Hamid A. A., Akhtar M. T., Anwar F., Rashid U., Al-Zuaidy M. H. An overview of recent developments in metabolomics and proteomics – phytotherapic research perspectives. *Frontiers in Life Science*. 2017;10(1):1–37. DOI: 10.1080/21553769.2017.1279573.
63. Yaseen K. M., Vimal K., Anuradha G., Niraj V., Siddharth P., Amee B. Reverse Pharmacognosy in New Drug Discovery. *Current Pharma Research Journal*. 2007;1(5):31–36.
64. Do Q.-T., Renimel I., Andre P., Lugnier C., Muller C. D., Bernard P. Reverse pharmacognosy: application of Selnergy, a new tool for lead discovery. The example of ε-viniferin. *Current drug discovery technologies*. 2005;2(3):161–167.
65. Blondeau S., Do Q. T., Scior T., Bernard P., Morin-Allory L. Reverse pharmacognosy: another way to harness the generosity of nature. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(15):1682–1696.
66. Лагунин А. А., Дружиловский Д. С., Рудик А. В., Филимонов Д. А., Гаванде Д., Сурeш К, Гоел Р., Поройков В. В. Возможности компьютерной оценки скрытого потенциала фитокомпонентов лекарственных растений из традиционной индийской медицины Аюрведа. *Биомедицинская химия*. 2015;61(2):286–297.
67. Lagunin A. A., Goel R. K., Gawande D. Y., Pahwa P., Gloriozova T. A., Dmitriev A. V., Druzhilovsky D. S. Chemo-and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Natural product reports*. 2014;31(11):1585–1611.
68. Allwood J. W., Ellis D. I., Goodacre R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum*. 2007;132:117–135. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01001.x.
69. Choi H.-C., Kim H. K., Linthorst H. J. M., Hollander J. G., Lefeber A. W. M., Erkelens C., Nuizllard J. M., Verpoorte R. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in Nicotiana tobacum leaves. *Journal of Natural Products*. 2006;69:742–748. DOI: 10.1021/np050535b.
70. Avio L., Turrini A., Giovannetti M., Sbrana C. Designing the Ideotype Mycorrhizal Symbionts for the Production of Healthy Food. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1–19. DOI: 10.3389/fpls.2018.01089.
71. Shtark O. Y., Puzanskiy R. K., Avdeeva G. S., Yurkov A. P., Smolikova G. N., Yemelyanov V. V., Kliukova M. S., Shavarda A. L., Kirpichnikova A. A., Zhernakov A. I., Afonin A. M., Tikhonovich I. A., Zhukov V. A., Shishova M. F. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development. *PeerJ*. 2019;7:e7495. DOI: 10.7717/peerj.7495.
72. Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Goodenowe D., Saxena P. K. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. *Plant Cell Reports*. 2004;23(6):419–425. DOI: 10.1007/s00299-004-0862-3.
73. Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D., Luzhanin V., Krasnova M., Okovityi S., Nosov A., Titova M., Tomilina S., Filimonov D., Poroikov V. Antihypoxic Action of *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* and *Dioscorea deltoidea* Cell Cultures: In Silico and Animal Studies. *Molecular Informatics*. 2020;39:1–12. DOI: 10.1002/minf.202000093.
74. Scognamiglio M., D'Abrosca B., Fiumano V., Golino M., Esposito A., Fiorentin A. Seasonal phytochemical changes in *Phillyrea angustifolia* L.: Metabolomic analysis and phytotoxicity assessment. *Phytochemistry Letters*. 2014:8:163–170. DOI: 10.1016/j.phytol.2013.08.012.

REFERENCES

1. Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. 1998;16(9):373–378. DOI:10.1016/S0167-7799(98)01214-1.

2. Sumner L. W., Mendes P., Dixon R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*. 2003;62(6):817–836.
3. Li Y., Li K., Zhang X. Next generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*. 2017;8:115774–115786. DOI: https://doi.org/10.18632/oncotarget.22404.
4. Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 2002;48:155–171. DOI: 10.1023/A:1013713905833.
5. Tugizimana F., Piater L., Dubery I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*. 2013;109(5-6):1–11.
6. Goncharov N. V., Ukolov A. I., Orlova T. I., Migalovskaia E. D., Voitenko N. G. Metabolomics: on the Way to Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015;135(1):3–17. (In Russ.).
7. Bingol K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. *High-throughput*. 2018;7(9):1–11. DOI: https://doi.org/10.3390/ht7020009.
8. Gorrochategui E., Jaumot J., Lacorte S., Tauler R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016;82:425–442.
9. Ott K. H., Araníbar N., Singh B., Stockton G. W. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry*. 2003;62(6):971–985.
10. Yang J., Song S. L., Castro-Perez J., Plumb R. S., Xu G. W. Metabonomics and its Applications. *Chinese journal of biotechnology*. 2005;21(1):1–5.
11. Lindon J. C., Holmes E., Nicholson J. K. Metabonomics Techniques and Applications to Pharmaceutical Research & Development. *Pharmaceutical Researches*. 2006;23:1075–1088. DOI: 10.1007/s11095-006-0025-z.
12. Wolfender J. L., Marti G., Thomas A., Bertrand S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*. 2015;1382:136–164.
13. Sung J., Lee S., Lee Y., Ha S., Song B., Kim T., Waters B. W., Krishnan H. B. Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Science*. 2015;241:55–64. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.09.027.
14. Kim H. K., Choi Y. H., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolic Fingerprinting of Ephedra Species Using 1H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2005;53(1):105–109. DOI: 10.1248/cpb.53.105.
15. Shimizu T., Watanabe M., Fernie A. R., Tohge T. Targeted LC-MS analysis for plant secondary metabolites. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2018;1778:171–181. DOI: 10.1007/978-1-4939-7819-9_12.
16. Sawada Y., Akiyama K., Sakata A., Kuwahara A., Otsuki H., Sakurai T., Saito K., Hirai M. Y. Widely Targeted Metabolomics Based on Large-Scale MS/MS Data for Elucidating Metabolite Accumulation Patterns in Plants. *Plant and Cell Physiology*. 2008;50(1):37–47. DOI: 10.1093/pcp/pcn183.
17. Okada T., Afendi F.M., Altaf-Ul-Amin M., Takahashi H., Nakamura K., Kanaya S. Metabolomics of Medicinal Plants: The Importance of Multivariate Analysis of Analytical Chemistry Data. *Current Computer Aided-Drug Design*. 2010;6(3):179–196. DOI: 10.2174/157340910791760055.
18. Cevallos-Cevallos J. M., Reyes-De-Corcuera J. I., Etxeberria E., Danyluk M. D., Rodrick G. E. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20(11-12):557–566. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.07.002.
19. Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*. 2010;5(3):536–549. DOI: 10.1038/nprot.2009.237.
20. Kim H. K., Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*. 2010;21(1):4–13. DOI: 10.1002/pca.1188.
21. Kruger N. J., Troncoso-Ponce M. A., Ratcliffe R. G. 1H NMR metabolite fingerprinting and metabolomic analysis of perchloric acid extracts from plant tissues. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1001–1012. DOI: 10.1038/nprot.2008.64.
22. Nair P., Kandasamy S., Zhang J., Ji X., Kirby C., Benkel B., Prithiviraj B. Transcriptional and metabolomic analysis of Ascophyllum nodosum mediated freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics*. 2012;13(1:643):1–23. DOI: 10.1186/1471-2164-13-643.
23. Angelcheva L., Mishra Y., Antti H., Kjellsen T. D., Funk C., Strimbeck R. G., Schröder W. P. Metabolomic analysis of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *New Phytologist*. 2014;204(3):545–555. DOI: 10.1111/nph.12950.
24. Arora R., Malhotra, P., Mathur A. K., Mathur A., Govil C. M., Ahuja P. S. Anticancer alkaloids of *Catharanthus roseus*: transition from traditional to modern medicine. Herbal Medicine: A Cancer Chemopreventive and Therapeutic Perspective. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Ltd; 2010. 292–310 p.
25. Weckwerth W., Kahl G. The handbook of plant metabolomics. Weinheim: John Wiley & Son; 2013. 424 p.
26. Putri S. P., Fukusaki E. Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide. Boca Raton: CRC Press; 2014. 294 p.
27. António C. Plant metabolomics: Methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2018. 355 p.
28. Wehrens R., Salek R. Metabolomics: practical guide to design and analysis. Boca Raton: CRC Press; 2018. 290 p.
29. Prokopiev I. A., Poryadina L. N., Konoreva L. A., Shavarda A. L., Filippova G. V. Metabolic profiling of *Cladonia* species (*Cladoniaceae*). *Rastitelnye resursy*. 2018;54(1):98–105. (In Russ.).
30. Loskutov I. G., Shelenga T. V., Konarev A. V., Shavarda A. L., Blinova E. V., Dzubenko N. I. the metabolomic approach to the comparative analysis of wild and cultivated species of oats (*Avena* L.). *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):636–642. (In Russ.).
31. Puzanskiy R. K., Emelyanov V. V., Gavrilenko T. A., Shishova M. F. The perspectives of metabolomics studies of potato plants. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):112–123. (In Russ.).
32. Kurkin V. A. *Metabolomika rastenij kak metodologicheskaja osnova standartizacii lekarstvennyh rastitel'nyh preparatov. Sbornik tezisov Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii "Garmonizacija podhodov k farmacevticheskoj razrabotke"* [Plant metabolomics as a methodological basis for the standardization of herbal medicinal products. Collection of abstracts of the International Scientific and Practical conference "Harmonization of approaches to pharmaceutical technical development"]; 28 Nov., 2018. Moscow: Peoples Friendship University of Russia. P. 107–109. (In Russ.).
33. Peterson E. S., McCue L. A., Schrimpe-Rutledge A. C., Jensen J. L., Walker H., Kobold M. A., Webb S. R., Payne S. H., Ansong Ch., Adkins J. N., Cannon W. R., Webb-Robertson B.-J. M. VESPA: software to facilitate genomic annotation of prokaryotic organisms through integration of proteomic and transcriptomic data. *BMC Genomics*. 2012;13(1:131):1–12. DOI: 10.1186/1471-2164-13-131.
34. Kumar D., Bansal G., Narang A., Basak T., Abbas T., Dash D. Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *PROTEOMICS*. 2016;16(19)2533–2544. DOI: 10.1002/pmic.201600140.
35. Gan H., Cai T., Lin X., Wu Y., Wang X., Yang F., Han C. Integrative Proteomic and Transcriptomic Analyses Reveal Multiple Post-transcriptional Regulatory Mechanisms of Mouse Spermatogenesi. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(5):1144–1157. DOI: 10.1074/mcp.m112.020123.
36. Xia J., Wishart D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016;55(1):1–91. DOI: 10.1002/cpbi.11.
37. Cherednichenko M. Yu., Dobronogova A. S., Polivanova O. B., Khlebnikova D. A., Sosina A. V. Fundamental and applied aspects of using systems biology. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2020;2(140):47–54. (In Russ.).
38. Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A. R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. 2006;1:387–396. DOI: 10.1038/nprot.2006.59.
39. De Vos R., Moco S., Lommen A., Keurentjes J. J. B., Bino R. J., Hall R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2007;2:778–791. DOI: 10.1038/nprot.2007.95.

40. Sawada Y., Hirai M. Y. Integrated LC-MS/MS system for plant metabolomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2013;4(5):1–6. DOI: 10.5936/csbj.201301011.
41. Hendriks M. M.W.B., Cruz-Juarez L., De Bont D., Hall R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Analytica Chimica Acta*. 2005;545(1):53–64. DOI: 10.1016/j.aca.2005.04.026.
42. Sumner L. W., Huhman D. V., Urbanczyk-Wochniak E., Lei Z. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: Secondary metabolism. *Plant Systems Biology. Experientia Supplementum*. 2007:97:195–212. DOI: 10.1007/978-3-7643-7439-6_9.
43. Hardy N. W., Hall R. D. Plant metabolomics: methods and protocols. *Humana Press*. 2012;860:1–10.
44. Kim H. K., Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2010;21(1):4–13.
45. Dobronogova A. S., Cherednichenko M. Yu. *Sintez vtorichnyh metabolitov v bioontologijah. Aktual'nye problemy botaniki i ohrany prirody* [Synthesis of secondary metabolites in bioontology. Actual problems of botany and nature protection]. 28–30 Nov., 2017. Simferopol; P. 146–152. (In Russ.).
46. Milman B. L., Zhurkovich I. K. Selected statistics of the use of mass spectral libraries. *Mass-spektrometrija = Mass-spektrometria*. 2014;11(2):123–125. (In Russ.).
47. Fukushima A., Kusano M. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. *Frontiers in plant science*. 2013;4:1–39. DOI: 10.3389/fpls.2013.00073.
48. Sorokina M., Steinbeck, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*. 2020;12:1–51.
49. Nguyen-Vo T. H., Nguyen L., Do N., Nguyen T. N., Trinh K., Cao H., Le L. T. Plant Metabolite Databases: From Herbal Medicines to Modern Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2020;60(3):1101–1110. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00826.
50. Mattoli L., Cangi F., Maidecchi A., Ghiara C., Ragazzi E., Tubaro M., Stella L., Tisato F., Traldi P. Metabolomic fingerprinting of plant extracts. *Journal of Mass Spectrometry.* 2006;41(12):1534–1545. DOI: 10.1002/jms.1099.
51. Wolfendera J.-L., Glausera G., Boccardb J., Rudazb S. MS-based Plant Metabolomic Approaches for Biomarker Discovery. *Natural Product Communications*. 2009;4(10):1417–1430. DOI: 10.1177/1934578X0900401019.
52. Van der Kooy F., Verpoorte R., Meyer J.J.M. Metabolomic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. *South African Journal of Botany*. 2008;74(2):186–189. DOI: 10.1016/j.sajb.2007.10.004.
53. Mukherjee P. K., Harwansh R. K., Bshsdur S., Biswas S., Kuchibhatia L. N., Tetali S. D., Raghavendra A. S. Metabolomics of medicinal plants–a versatile tool for standardization of herbal products and quality evaluation of ayurvedic formulations. *Current Science*. 2016;111(10):1624–1630.
54. Frédérich M., Choi Y. H., Angenot L., Harnischfeger G., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolomic analysis of Strychnos nux-vomica, Strychnos icaja and Strychnos ignatii extracts by 1H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques. *Phytochemistry*. 2004;65(13):1993–2001.
55. Tuyiringire N., Tusubira D., Munyampundu J.-P., Tolo C. U., MuvunyiC. M., Ogwang P. E. Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity. *Clinical and translational medicine*. 2018;7(29):1–12. DOI: 10.1186/s40169-018-0208-3.
56. Tuyiringire N., Tusubira D., Munyampundu J.-P., Tolo C. U., Muvunyi C. M., Ogwang P. E. Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity. *Clinical and translational medicine*. 2018;7(29):1–12. DOI: 10.1186/s40169-018-0208-3.
57. Chadin I. Chemosystematics – the basis for the study of plant biochemical diversity. *Vestnik Instituta biologii Komi NTs UrO RAN*. 2001;46:23–25. (In Russ.).
58. Wang H. P., Liu Y., Chen C., Xiao H. B. Screening specific biomarkers of herbs using a metabolomics approach: a case study of *Panax ginseng*. *Scientific reports*. 2017;7(1):1–9.
59. Mišić D., Šiler B., Gašić U., Avramov S., Živković S., Nestorović Živković J., Milutinović M., Tešić Ž. Simultaneous UHPLC/DAD/(+/–) HESI-MS/MS Analysis of Phenolic Acids and Nepetalactones in Methanol Extracts of *Nepeta* Species: A Possible Application in Chemotaxonomic Studies. *Phytochemical Analysis*. 2015;26(1):72–85. DOI: 10.1002/pca.2538.
60. Sun B., Wu S., Li L., Li H., Zhang Q., Chen H., Li F., Dong F., Yan X. A metabolomic analysis of the toxicity of Aconitum sp. alkaloids in rats using gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2009;23(8):1221–1228. DOI: 10.1002/rcm.3992.
61. Zhang X., Wu H., Liao P., Li X., Ni J., Pei F. NMR-based metabonomic study on the subacute toxicity of aristolochic acid in rats. *Food and chemical toxicology*. 2006;44(7):1006–1014. DOI: 10.1016/j.fct.2005.12.004.
62. Mumtaz M. W., Hamid A. A., Akhtar M. T., Anwar F., Rashid U., Al-Zuaidy M. H. An overview of recent developments in metabolomics and proteomics – phytotherapic research perspectives. *Frontiers in Life Science*. 2017;10(1):1–37. DOI: 10.1080/21553769.2017.1279573.
63. Yaseen K. M., Vimal K., Anuradha G., Niraj V., Siddharth P., Amee B. Reverse Pharmacognosy in New Drug Discovery. *Current Pharma Research Journal*. 2007;1(5):31–36.
64. Do Q.-T., Renimel I., Andre P., Lugnier C., Muller C. D., Bernard P. Reverse pharmacognosy: application of Selnergy, a new tool for lead discovery. The example of ε-viniferin. *Current drug discovery technologies*. 2005;2(3):161–167.
65. Blondeau S., Do Q. T., Scior T., Bernard P., Morin-Allory L. Reverse pharmacognosy: another way to harness the generosity of nature. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(15):1682–1696.
66. Lagunin A. A., Druzhilovskiy D. S., Rudik A. V., Filimonov D. A., Gawande D., Suresh K., Goel R., Poroikov V. V. Computer evaluation of hidden potential of phytochemicals of medicinal plants of the traditional Indian Ayurvedic medicine. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015;61(2):286–297. (In Russ.).
67. Lagunin A. A., Goel R. K., Gawande D. Y., Pahwa P., Gloriozova T. A., Dmitriev A. V., Druzhilovsky D. S. Chemo-and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Natural product reports*. 2014;31(11):1585–1611.
68. Allwood J. W., Ellis D. I., Goodacre R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum*. 2007;132:117–135. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01001.x.
69. Choi H.-C., Kim H. K., Linthorst H. J. M., Hollander J. G., Lefeber A. W. M., Erkelens C., Nuizllard J. M., Verpoorte R. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in Nicotiana tobacum leaves. *Journal of Natural Products*. 2006;69:742–748. DOI: 10.1021/np050535b.
70. Avio L., Turrini A., Giovannetti M., Sbrana C. Designing the Ideotype Mycorrhizal Symbionts for the Production of Healthy Food. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1–19. DOI: 10.3389/fpls.2018.01089.
71. Shtark O. Y., Puzanskiy R. K., Avdeeva G. S., Yurkov A. P., Smolikova G. N., Yemelyanov V. V., Kliukova M. S., Shavarda A. L., Kirpichnikova A. A., Zhernakov A. I., Afonin A. M., Tikhonovich I. A., Zhukov V. A., Shishova M. F. Metabolic alterations in pea leaves during arbuscular mycorrhiza development. *PeerJ*. 2019;7:e7495. DOI: 10.7717/peerj.7495.
72. Murch S. J., Rupasinghe H. P. V., Goodenowe D., Saxena P. K. A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. *Plant Cell Reports*. 2004;23(6):419–425. DOI: 10.1007/s00299-004-0862-3.
73. Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D., Luzhanin V., Krasnova M., Okovityi S., Nosov A., Titova M., Tomilina S., Filimonov D., Poroikov V. Antihypoxic Action of *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* and *Dioscorea deltoidea* Cell Cultures: In Silico and Animal Studies. *Molecular Informatics*. 2020;39:1–12. DOI: 10.1002/minf.202000093.
74. Scognamiglio M., D'Abrosca B., Fiumano V., Golino M., Esposito A., Fiorentin A. Seasonal phytochemical changes in *Phillyrea angustifolia* L.: Metabolomic analysis and phytotoxicity assessment. *Phytochemistry Letters*. 2014:8:163–170. DOI: 10.1016/j.phytol.2013.08.012.

XVI Международная конференция

«Фармацевтический бизнес в России – 2021»

11 марта 2021 г., Москва

Полное погружение в реальность фармрынка.
Найдем болевые точки отрасли, назначим лечение и проведем профилактику!

Возможность принять участие в формировании деловой повестки:
задайте свои вопросы ведущим фармэкспертам, и мы гарантируем, что ответы на них прозвучат со сцены

Микс-формат:
примите участие очно, на площадке мероприятий, или дистанционно, посредством подключения к интернет-трансляции

Максимум практической пользы!
Наши мероприятия предназначены для тех, кто хочет получить новые знания и навыки, найти точки роста и драйверы развития своей компании!

18+

реклама

Регистрация на сайте: **infor-media.ru**
Подробности по тел. +7 495 995-80-04 и по e-mail e.pronenko@infor-media.ru

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-107-113
УДК 615.072

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Стандартизация лекарственного препарата «Чемеричная вода», получаемого на основе чемерицы Лобеля (*Veratrum lobelianum* Bernh.), по показателю «Количественное определение»

Е. В. Мельник[1]*, М. В. Белова[1,2], И. А. Тюрин[2], Г. В. Раменская[1]

1 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
2 – ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»), 129090, Россия, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3

***Контактное лицо:** Мельник Елизавета Валерьевна. **E-mail:** melnik.elizaveta.v@gmail.com

ORCID: Е. В. Мельник – https://orcid.org/0000-0002-9727-9452; М. В. Белова – https://orcid.org/0000-0002-0861-5945; И. А. Тюрин – https://orcid.org/0000-0002-4071-1099; Г. В. Раменская – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Статья поступила: 15.01.2021. **Статья принята в печать:** 16.02.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания оценка качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» проводится титриметрическим методом по сумме алкалоидов. Для лекарственного препарата «Чемеричная вода», который производится из данного ЛРС, также отсутствуют селективные и чувствительные методики количественного определения действующих веществ при помощи инструментальных методов анализа. В этой связи является актуальным изучение алкалоидного состава чемеричной воды и разработка современной методики количественного определения индивидуального алкалоида для целей стандартизации данного лекарственного препарата.

Цель. Разработка подхода к стандартизации лекарственного препарата «Чемеричная вода» по показателю «Количественное определение».

Материалы и методы. Были разработаны методика определения алкалоидов чемерицы в исследуемых образцах лекарственного препарата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), а также методика количественного определения иервина, основного алкалоида в составе чемеричной воды, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДАД).

Результаты и обсуждение. В результате ВЭЖХ-МС/МС-анализа были определены три основных алкалоида в составе чемеричной воды – иервин, протоveратрин А и протоveратрин В. По результатам количественной оценки иервин, как превалирующий в составе чемеричной воды алкалоид, был выбран для дальнейшей разработки более доступной методики анализа методом ВЭЖХ-ДАД. Данная методика была валидирована по параметрам специфичности, линейности, правильности и прецизионности. Были определены концентрации иервина в семи испытуемых образцах чемеричной воды различных производителей.

Заключение. Наибольшая концентрация иервина в исследуемых образцах чемеричной воды составила 170 мкг/мл, наименьшая – 136 мкг/мл. С целью стандартизации чемеричной воды предлагается ввести показатель качества «Количественное определение. Содержание иервина должно быть не менее 136 мкг/мл». Данный показатель может быть определен методом ВЭЖХ-ДАД.

Ключевые слова: чемеричная вода, чемерица, иервин, алкалоиды, ВЭЖХ-ДАД, ВЭЖХ-МС/МС, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. В. Мельник и И. А. Тюрин разработали аналитическую методику и провели ее валидацию. М. В. Белова и Г. В. Раменская участвовали в обработке полученных результатов. Все авторы участвовали в написании статьи, а также в обсуждении результатов.

Для цитирования: Мельник Е. В., Белова М. В., Тюрин И. А., Раменская Г. В. Стандартизация лекарственного препарата «Чемеричная вода», получаемого на основе чемерицы Лобеля (*Veratrum lobelianum* Bernh.), по показателю «Количественное определение». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):107–113. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-107-113

Quantitative Content Parameter in the Standardization of Veratrum Aqua, *Veratrum Lobelianum* Bernh. Based Drug

Elizaveta V. Melnik[1]*, Maria V. Belova[1,2], Igor A. Tyurin[2], Galina V. Ramenskaya[1]

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 – N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Health Department, 3, Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russia

***Corresponding author:** Elizaveta V. Melnik. **E-mail:** melnik.elizaveta.v@gmail.com

ORCID: Elizaveta V. Melnik – https://orcid.org/0000-0002-9727-9452; Maria V. Belova – https://orcid.org/0000-0002-0861-5945; Igor A. Tyurin – https://orcid.org/0000-0002-4071-1099; Galina V. Ramenskaya – https://orcid.org/0000-0001-8779-3573.

Received: 15.01.2021. **Revised:** 16.02.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. According to the XIV Edition of the Russian Federation State Pharmacopoeia, the quality control of the «Veratrum Lobelianum rhizome and roots» herbal substance is carried out through the determination of the alkaloid sum by means of the titration-based method. There are no selective and sensitive instrumental methods for the quantitative analysis of veratrum aqua active ingredients either. Veratrum aqua is produced from the mentioned above herbal substance. Therefore, the study of veratrum aqua alkaloid composition is relevant, as well as the development of a modern analytical method for individual alkaloid determination that can be implemented in veratrum aqua standardization.

© Мельник Е. В., Белова М. В., Тюрин И. А., Раменская Г. В., 2021
© Melnik E. V., Belova M. V., Tyurin I. A., Ramenskaya G. V., 2021

Aim. To develop an approach to the quantitative analysis in Veratrum Aqua standardization.
Materials and methods. Two analytical methods were developed: one for the veratrum alkaloid determination in veratrum aqua samples by means of high performance liquid chromatography coupled with tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS), another – for jervine, the main veratrum aqua alkaloid, quantitation by means of HPLC with diode-array detector (HPLC-DAD).
Results and discussion. Three main alkaloids, namely jervine, protoveratrine A and protoveratrine B, were identified in veratrum aqua. Jervine was found to be the most abundant one, hence it was chosen for the further development of a more affordable HPLC-DAD method. This method was validated for specificity, linearity, accuracy and precision. Jervine concentrations were measured in seven veratrum aqua samples produced by different manufacturers.
Conclusion. The highest jervine concentration among the examined samples was found to be 170 μg/ml, the lowest – 136 μg/ml. It is proposed to implement the following quantitative content parameter in veratrum aqua standardization: «Quantitative test. Jervine content should be not less than 136 μg/ml». This parameter is to be determined by HPLC-DAD.

Keywords: veratrum aqua, veratrum, jervine, alkaloids, HPLC-DAD, HPLC-MS/MS, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Elizaveta V. Melnik and Igor A. Tyurin developed and validated the analytical method. Maria V. Belova and Galina V. Ramenskaya participated in the processing of the data obtained. All authors participated in writing the manuscript as well as the discussion of the results.

For citation: Melnik E. V., Belova M. V., Tyurin I. A., Ramenskaya G. V. Quantitative content parameter in the standardization of Veratrum Aqua, *Veratrum lobelianum* Bernh. based drug. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):107–113. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-107-113

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день единственным представителем рода Чемерица *(Veratrum,* семейство Лилейные – *Liliaceae*), разрешенным к использованию в фармацевтической практике в России, является чемерица Лобеля (*Veratrum Lobelianum* Bernh.) [1]. Из лекарственного растительного сырья (ЛРС) «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» производят лекарственный препарат «Чемеричная вода», представляющий собой настойку чемерицы, разбавленную водой очищенной в соотношении 1:1 [2]. Чемеричная вода используется наружно в качестве противопаразитарного (противопедикулезного) средства. Основными действующими веществами, содержащимися во всех частях растения, являются стероидные алкалоиды. Все алкалоиды чемерицы обладают высокой токсичностью, поэтому употребление самого растения или его препаратов приводит к острому отравлению, требующему немедленного оказания медицинской помощи [3]. Согласно [4, 5] в состав алкалоидов, содержащихся в чемерице Лобеля, входят иервин, псевдоиервин, цевадин, протовератрины А и В и др.

Согласно Государственной Фармакопее XIV издания для ЛРС «Чемерицы Лобеля корневища с корнями» количественное определение проводят методом кислотно-основного титрования по содержанию суммы алкалоидов в пересчете на протовератрин (не менее 1,0 %). В доступной отечественной литературе отсутствует информация о стандартизации чемеричной воды по показателю «Количественное определение», а также о количественном составе отдельных алкалоидов в составе лекарственного препарата. В связи с этим представляет интерес определение основных индивидуальных алкалоидов в составе чемеричной воды и выбор алкалоида, содержащегося в наибольшем количестве в данном лекарственном препарате. Такой алкалоид можно использовать в качестве показателя, контролируемого при стандартизации чемеричной воды.

Цель работы – разработать подход к стандартизации лекарственного препарата «Чемеричная вода» по показателю «Количественное определение». Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач:

- определение основных алкалоидов в образцах чемеричной воды различных производителей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с количественной оценкой и последующим выбором алкалоида, содержащегося в наибольшем количестве;
- разработка методики количественного определения основного алкалоида в составе чемеричной воды методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием (ВЭЖХ-ДАД), ее валидация и установление нижнего порогового значения содержания выбранного алкалоида в чемеричной воде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Определение алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II с масс-спектрометром Agilent 6460, программное обеспечение MassHunter Workstation Software ver. B.09.00 (все

Agilent Technologies, США). Определение алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-ДАД проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 Series с диодно-матричным детектором Agilent G1315D, программное обеспечение OpenLAB CDS ChemStation Edition ver. C.01.04 (все Agilent Technologies, США). Сверхчистую воду получали при помощи системы очистки воды HPLC CB-2303 (Adrona, Латвия).

Реактивы и растворы

Использовались реактивы: муравьиная кислота LC-MS-grade (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил HPLC-grade (J.T. Baker, Польша), метанол HPLC-grade (J.T. Baker, Польша), диметилсульфоксид (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия). Использовались стандартные образцы: иервин (содержание иервина 100 %, срок годности до 02.2022, Sigma-Aldrich, США), протовератрин А (содержание протовератрина А 99 %, срок годности до 09.2022, PhytoLab GmbH & Co. KG, Германия), хинидин безводный (внутренний стандарт (ВС) методики, содержание хинидина 88 %, срок годности до 07.2022, Sigma-Aldrich, США). Исходные стандартные растворы готовили путем растворения 1 мг иервина (здесь и далее: точная навеска) в 1 мл метанола, 1 мг протовератрина А в 0,99 мл диметилсульфоксида, 1 мг хинидина в 0,88 мл метанола. Концентрации исходных стандартных растворов были равны 1 мг/мл.

Объектами исследования являлись образцы чемеричной воды четырех отечественных производителей различных серий (образцы № 1-7).

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ-МС/МС

Предварительно все образцы чемеричной воды были профильтрованы через мембранный фильтр (CHROMAFIL® Xtra PA 20/25, Macherey-Nagel, Германия). Пробоподготовка образцов при первичном поиске алкалоидов в составе чемеричной воды заключалась в 10-кратном разбавлении смесью ацетонитрил/вода (1:2), а затем в 1000-кратном разбавлении при количественном определении алкалоидов. Хроматографическое разделение проводили на колонке Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 100 мм, 2,7 мкм) с предколонкой Poroshell 120 EC-C18 (4,6 × 5 мм, 4 мкм, обе Agilent Technologies, США). Подробные условия хроматографического разделения и тандемного масс-спектрометрического детектирования алкалоидов чемерицы описаны в работе [6].

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ-ДАД

Пробоподготовка проводилась следующим образом: в стеклянную виалу вносили 100 мкл предварительно профильтрованного исследуемого образца чемеричной воды (либо калибровочного раствора), добавляли 40 мкл ВС (рабочий стандартный раствор хинидина с концентрацией 200 мкг/мл) и полученную смесь выпаривали в токе азота при комнатной температуре. Тем самым удалялась спирто-водная основа чемеричной воды. Затем сухой остаток реконструировали в 1 мл смеси ацетонитрил/вода (1:2).

Одновременное детектирование иервина и ВС проводили при длине волны 250 нм (диапазон 2 нм). Подвижная фаза состояла из элюента А (0,2 % муравьиная кислота в воде) и элюента В (0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле). Хроматографическое разделение проводили на указанной выше колонке с предколонкой Poroshell 120 EC-C18. Температура термостата колонки составила 40 °С, скорость потока – 0,8 мл/мин, объем вводимой пробы – 2 мкл, общее время хроматографирования – 13 минут. Режим элюирования представлен в таблице 1.

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД

Table 1. Gradient elution program for HPLC-DAD jervine determination

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0:00	90	10
1:00	90	10
1:10	80	20
8:00	60	40
8:10	10	90
9:00	10	90
9:10	90	10
10:00	90	10
13:00	90	10

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение основных алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС

В ходе первой части исследования был проанализирован алкалоидный состав образцов чемеричной воды различных производителей, разбавленных в 10 раз смесью ацетонитрил/вода (1:2), методом ВЭЖХ-МС/МС. Для этого проводили масс-спектрометрическое определение в режиме полного сканирования, а также в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). MRM-переходы были выбраны на основании литературных данных [7, 8]. Было установлено, что основными алкалоидами в составе чемеричной воды являются иервин, протовератрин А и протовератрин В. Время удерживания иервина составило 6,9 мин, протовератрина А – 9,2 мин, протовератрина В – 7,6 мин (рисунок 1). При анализе образцов чемеричной воды не были обнаружены вератридин, цевадин, псевдоиервин, вератрозин, вератрамин.

Затем была проведена количественная оценка содержания иервина и протовератрина А в образцах чемеричной воды. Вследствие отсутствия стандартного образца протовератрина В, его количественное определение не проводилось. В качестве пробоподготовки исследуемые образцы разбавляли в 1000 раз

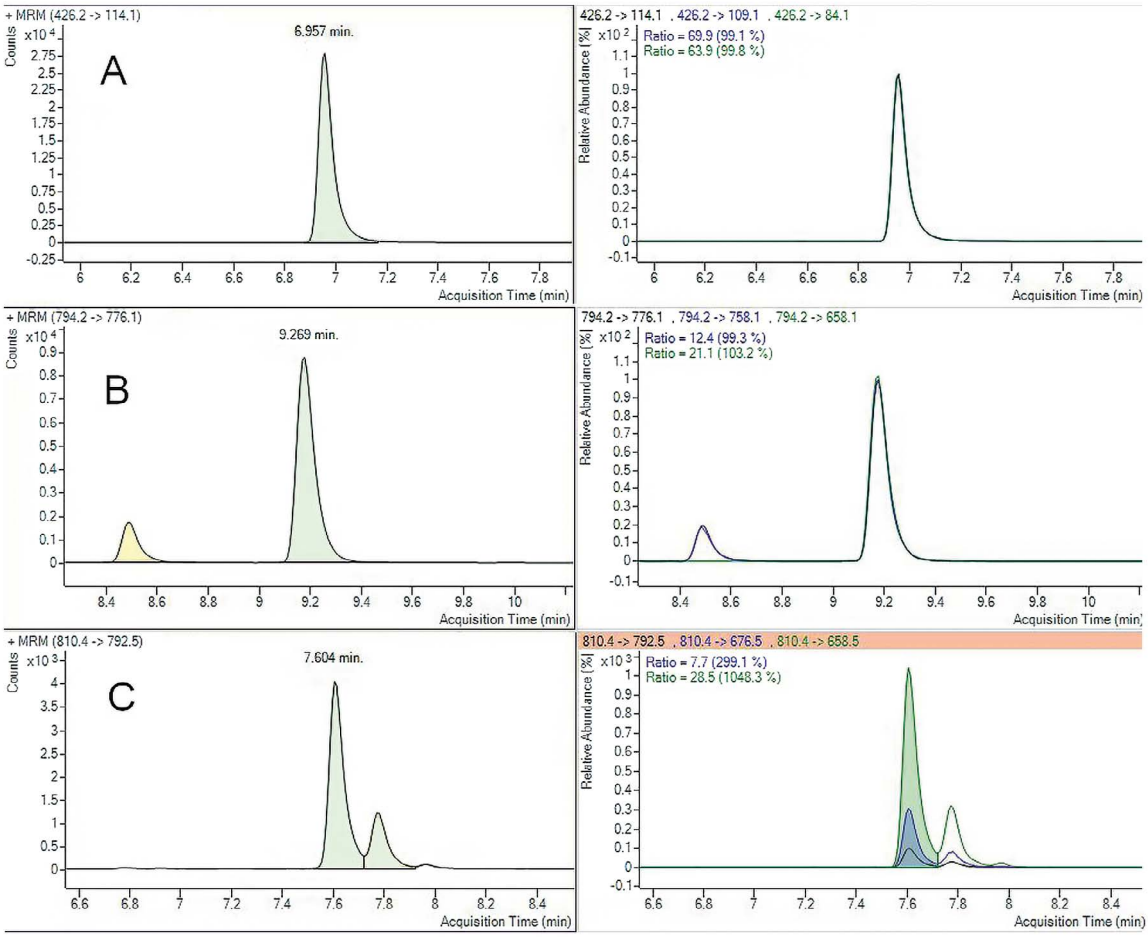


Рисунок 1. **Хроматограмма образца чемеричной воды**
А – иервин; В – протоveратрин А; С – протоveратрин В

Figure 1. **Veratrum Aqua chromatogram**
A – jervine; B – protoveratrine A; C – protoveratrine B

смесью ацетонитрил/вода (1:2). Готовили калибровочные образцы (5 уровней) с концентрациями иервина 100, 137,5, 175, 212,5, 250 мкг/мл и с концентрациями протоveратрина А 40, 55, 70, 85, 100 мкг/мл. Калибровочные кривые строили методом абсолютной калибровки. Пробоподготовка калибровочных образцов проводилась таким же способом, как и для образцов чемеричной воды. В выбранном диапазоне концентраций наблюдалась линейная зависимость отклика детектора от концентрации алкалоида в образце. Данная методика не валидировалась.

По результатам анализа были определены наибольшие и наименьшие концентрации иервина и протоveратрина А в образцах чемеричной воды различных производителей. Для иервина наибольшая концентрация составила 170 мкг/мл, наименьшая – 136 мкг/мл. Для протоveратрина А наибольшая концентрация составила 77 мкг/мл, наименьшая – 69 мкг/мл. Исходя из вышесказанного, иервин как алкалоид, превалирующий в составе чемеричной воды, был выбран для дальнейшей разработки методики ВЭЖХ-ДАД-анализа.

Разработка методики количественного определения иервина в чемеричной воде методом ВЭЖХ-ДАД

Вследствие того, что диодно-матричный детектор обладает более низкой чувствительностью в сравнении с масс-спектрометрическим детектором, пробоподготовка была изменена с 1000-кратного до 10-кратного разбавления испытуемых и калибровочных образцов. Помимо этого, в данную пробоподготовку было включено использование ВС для того, чтобы учесть возможные потери аналитов.

Методика хроматографического разделения аналитов была оптимизирована под задачи ВЭЖХ-ДАД-анализа. Режим градиентного элюирования был изменен для лучшего разделения иервина и ВС от сторонних компонентов чемеричной воды, а также примеси дигидрохинидина. Хроматограммы чистого растворителя [смесь ацетонитрил/вода (1:2)], калибровочного образца и образца чемеричной воды представлены на рисунках 2, 3, 4 соответственно. При данных условиях время удерживания иервина составляло 7,7 мин, хинидина – 4,2 мин, дигидрохинидина – 4,5 мин.

Валидация методики количественного определения иервина в чемеричной воде методом ВЭЖХ-ДАД

Валидация аналитической методики включала оценку правильности, прецизионности, специфичности и линейности согласно требованиям руководства В. В. Береговых [9]. Специфичность методики определялась путем сравнения хроматограмм чистого растворителя, калибровочного образца и образца чемеричной воды (рисунки 2–4). На хроматограмме чистого растворителя отсутствовали пики с временами удерживания, соответствующими иервину и ВС.

Линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций 80–160 % (уровни диапазона 80, 100, 120, 140, 160 %) от выбранного нормируемого значения концентрации иервина. На основании результатов ВЭЖХ-МС/МС-анализа было выбрано наименьшее содержание иервина в испытуемых образцах чемеричной воды, равное 136 мкг/мл.

Калибровочные образцы готовили путем серии разведений исходного стандартного раствора иервина (концентрация 1 мг/мл) с концентрациями 109, 136, 163, 190, 218 мкг/мл. Разведение проводили сверхчистой водой с целью моделирования спирто-водной основы чемеричной воды.

Наблюдалась линейная зависимость в диапазоне концентраций от 80 до 160 % нормируемой концентрации иервина, которая описывалась уравнением $y = 0{,}0071x + 0{,}003$. Квадрат коэффициента корреляции был равен 0.9994. Калибровочный график представлен на рисунке 5.

Правильность и прецизионность методики была подтверждена путем трехкратного повтора аналитической методики для всех уровней диапазона методики ($n = 15$). Правильность методики оценивалась путем сравнения экспериментально полученных значений с истинными теоретическими значениями. Правильность была рассчитана как отношение среднего значения экспериментально полученных концентраций иервина к теоретическому содержанию иервина

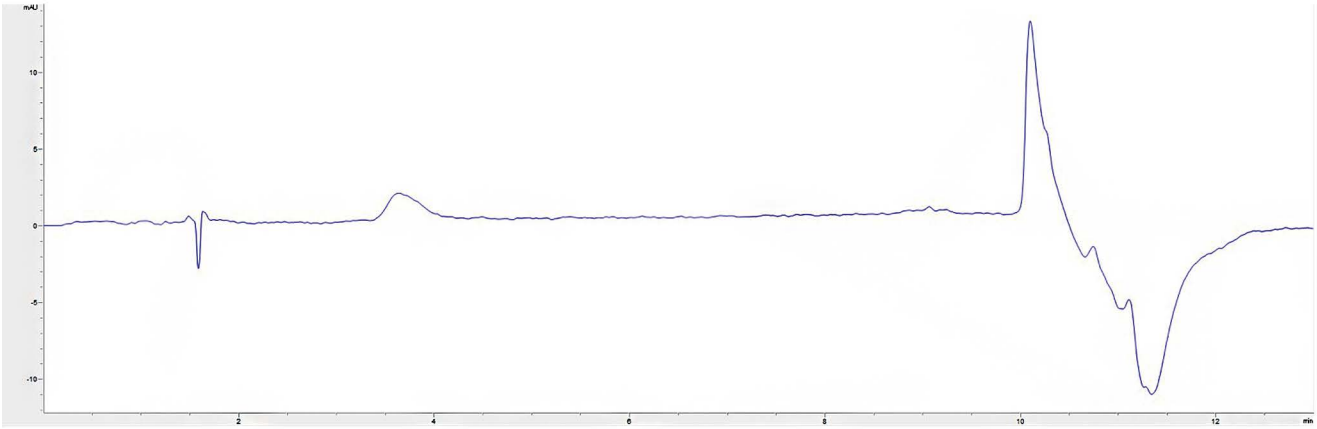


Рисунок 2. **Хроматограмма чистого растворителя (смесь ацетонитрил/вода, 1:2)**

Figure 2. **Pure solvent chromatogram (mixture of acetonitrile/water, 1:2)**

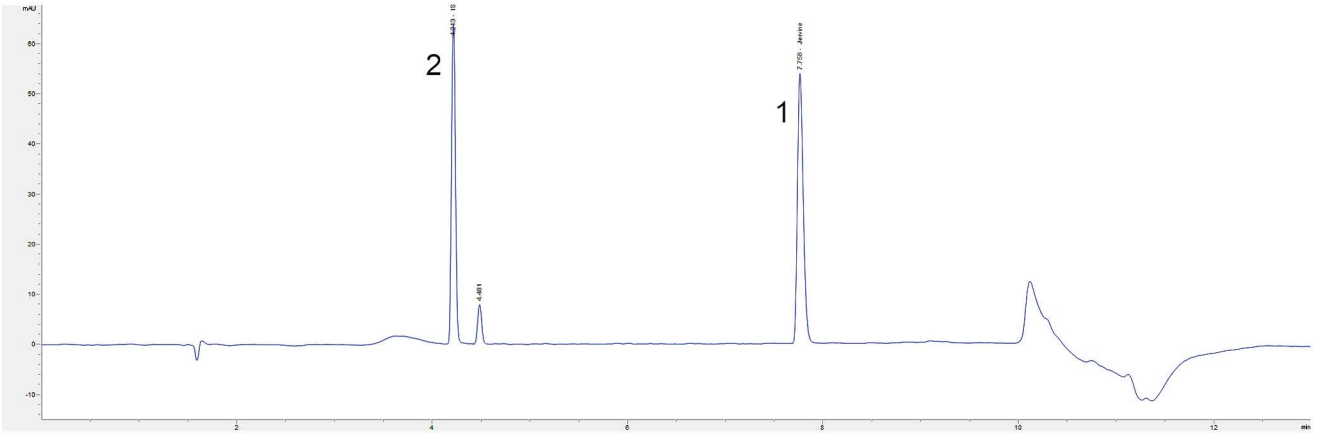


Рисунок 3. **Хроматограмма калибровочного образца**
1 – иервин; 2 – ВС

Figure 3. **Calibration sample chromatogram**
1 – jervine; 2 – IS

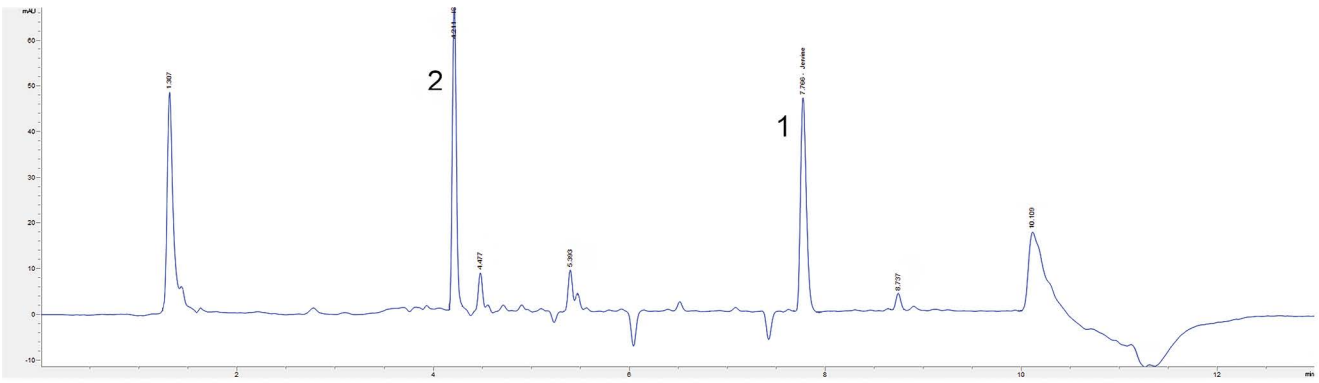


Рисунок 4. **Хроматограмма образца чемеричной воды**
1 – иервин; 2 – ВС

Figure 4. **Veratrum Aqua chromatogram**
1 – jervine; 2 – IS

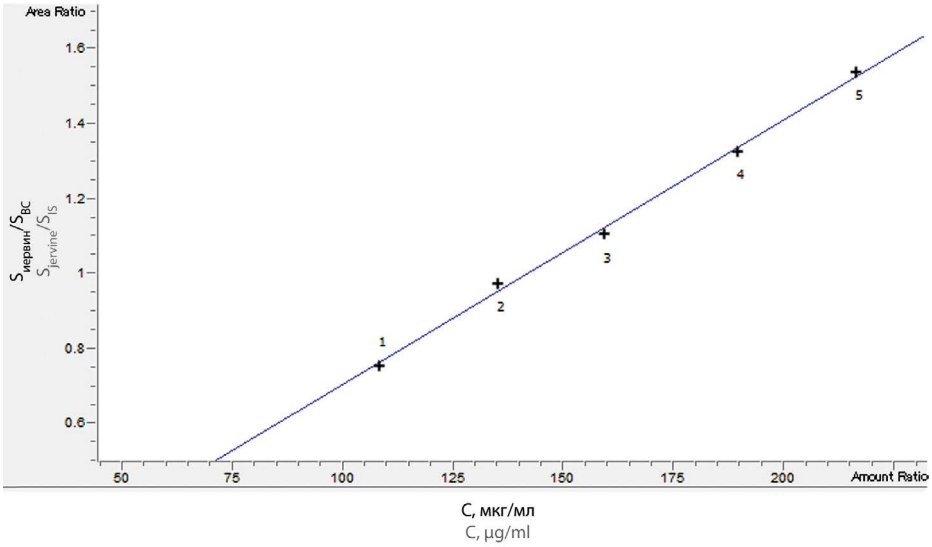


Рисунок 5. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика иервина к площади пика ВС ($S_{иервин}/S_{ВС}$) от концентрации иервина (С) в анализируемом образце (мкг/мл)**

Figure 5. **The calibration curve constructed by plotting the ratio of jervine to IS peak area ($S_{jervine}/S_{IS}$) versus jervine concentration (C) in the analyzed sample (µg/ml)**

в образцах для каждого из уровней диапазона методики. Правильность составила 99,08–100,49 %. Оценку прецизионности проводили путем вычисления относительного стандартного отклонения экспериментально полученных значений концентраций иервина. Полученные значения находились в диапазоне 0,61–1,85 %. Результаты оценки правильности и прецизионности методики представлены в таблице 2.

Содержание иервина было определено в трех параллельных пробах каждого из испытуемых образцов чемеричной воды ($n = 3$). По результатам измерений было рассчитано среднее значение содержания иервина, которое и принималось за итоговый результат анализа. Были получены следующие результаты содержания иервина в испытуемых образцах чемеричной воды (мкг/мл): 151, 136, 165, 139, 166, 164, 170.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в испытуемых образцах чемеричной воды содержание иервина, полученное по результатам ВЭЖХ-МС/МС-анализа, подтвердилось данными ВЭЖХ-ДАД-анализа. Наибольшая концентрация иервина составила 170 мкг/мл, наименьшая – 136 мкг/мл. Вследствие того, что все испытуемые образцы были приобретены в аптеке, то есть находились в гражданском обороте лекарственных препаратов, они должны соответствовать всем требуемым показателям качества. Исходя из этого, наименьшую концентрацию иервина, полученную в данном исследовании, следует принять за нижнее пороговое значение содержания иервина в чемеричной воде. Для стандартизации лекарственного препарата «Чемеричная вода»

предлагается ввести показатель качества: «Количественное определение. Содержание иервина должно быть не менее 136 мкг/мл».

Таблица 2. Результаты оценки правильности и прецизионности определения иервина методом ВЭЖХ-ДАД

Table 2. The results of accuracy and precision for HPLC-DAD jervine determination.

Уровень диапазона методики, % Concentration level, %	Теоретическое содержание иервина, мкг/мл Nominal jervine concentration, (μg/ml)	Найдено, мкг/мл Found, (μg/ml)	Правильность, % Accuracy, %	Относительное стандартное отклонение, % Relative standard deviation, %
80	109	110	99,08	1,85
		106		
		108		
100	136	134	100,49	1,84
		137		
		139		
120	163	161	99,80	1,77
		166		
		161		
140	190	191	100,18	0,61
		191		
		189		
160	218	219	99,69	1,33
		214		
		219		

ЛИТЕРАТУРА

1. Чемерицы Лобеля корневища с корнями. ФС.2.5.0104.18. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание: официальный текст. XIV изд. М.: Федеральная электронная медицинская библиотека; 2018. Доступно по: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php Ссылка активна на 14.02.2021.
2. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx Ссылка активна на 14.02.2021.
3. Мишина Т. П., Лукьянова И. Ю., Бидерман Ф. М., Афанасьева И. В. Отравление чемерицей. *Скорая медицинская помощь*. 2013;14(3):48-51.
4. Li H.-J., Jiang Y., Li P. Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family. *Natural Product Reports*. 2006;23(5):735–752. DOI: 10.1039/b609306j.
5. Shakirov R., Yunusov S. Yu. Alkaloids of Veratrum, Petilium, and Korolkowia. *Chemistry of Natural Compounds*. 1980;16(1):1–16. DOI: 10.1007/BF00564867.
6. Melnik E. V., Belova M. V., Potskhveriya M. M., Simonova A. Yu., Tyurin I. A., Ramenskaya G. V. Veratrum Alkaloid Determination in Four Cases of Veratrum Aqua Poisonings. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021:1–18. DOI: 10.1093/jat/bkab019.
7. Grobosch T., Binscheck T., Martens F., Lampe D. Accidental Intoxication with Veratrum album. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008;32(9):768–773. DOI: 10.1093/jat/32.9.768.
8. Anwar M., Turner M., Farrell N., Zomlefer W. B., McDougal O. M., Morgan B. W. Hikers poisoned: Veratrum steroidal alkaloid toxicity following ingestion of foraged Veratrum parviflorum. *Clinical Toxicology*. 2018;56(9):841–845. DOI: 10.1080/15563650.2018.1442007.
9. Береговых В. В., ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: Литтерра. 2008. 132 с.

REFERENCES

1. *Chemericy Lobelya kornevishcha s kornyami* [Veratrum Lobelianum rhizome and roots]. FS.2.5.0104.18. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition: official text. Moscow: Federal'naya elektronnaya medicinskaya biblioteka; 2018. Available at: http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php Accessed: 14.02.2021. (In Russ.).
2. *Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv* [State register of medicines of Russia]. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx. Accessed: 14.02.2021. (In Russ.).
3. Mishina T. P., Lukyanova I. Yu., Biederman F. M., Afanaseva I. V. Poisoning hellebore. *Skoraya medicinskaya pomoshch = Emergency medical care*. 2013;14(3):48–51. (In Russ.)
4. Li H.-J., Jiang Y., Li P. Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family. *Natural Product Reports*. 2006;23(5):735–752. DOI: 10.1039/b609306j.
5. Shakirov R., Yunusov S. Yu. Alkaloids of Veratrum, Petilium, and Korolkowia. *Chemistry of Natural Compounds*. 1980;16(1):1–16. DOI: 10.1007/BF00564867.
6. Melnik E. V., Belova M. V., Potskhveriya M. M., Simonova A. Yu., Tyurin I. A., Ramenskaya G. V. Veratrum Alkaloid Determination in Four Cases of Veratrum Aqua Poisonings. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021:1–18. DOI: 10.1093/jat/bkab019.
7. Grobosch T., Binscheck T., Martens F., Lampe D. Accidental Intoxication with Veratrum album. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008;32(9):768–773. DOI: 10.1093/jat/32.9.768.
8. Anwar M., Turner M., Farrell N., Zomlefer W. B., McDougal O. M., Morgan B. W. Hikers poisoned: Veratrum steroidal alkaloid toxicity following ingestion of foraged Veratrum parviflorum. *Clinical Toxicology*. 2018;56(9):841–845. DOI: 10.1080/15563650.2018.1442007.
9. Beregovykh V. V. *Validatsiya analiticheskikh metodik dlya proizvoditeleĭ lekarstv* [Validation of analytical procedures for drug manufacturers]. Moscow: Litterra; 2008. 132 p. (In Russ.).

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119
УДК 615.038

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша

А. Ю. Медкова[1], А. А. Лиджиева[1], Е. Г. Сёмин[1], Л. Н. Синяшина[1], Р. А. Сюндюкова[1], И. Н. Дьяков[2], Л. В. Колобухина[1], И. С. Кружкова[1], Л. Н. Меркулова[1], М. Г. Русанова[3], Н. А. Антипят[3], С. В. Сметанина[3], Г. И. Каратаев[1]*

1 – ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
2 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова), 105064, Россия, г. Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а
3 – ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»), 125310, Россия, г. Москва, Волоколамское ш., д. 63

***Контактное лицо:** Каратаев Геннадий Иванович. **E-mail:** karataevgi@rambler.ru

ORCID: А. Ю. Медкова – https://orcid.org/0000-0002-1509-0622; А. А. Лиджиева – https://orcid.org/0000-0002-1537-6444; Е. Г. Сёмин – https://orcid.org/0000-0001-6696-8362; Л. Н. Синяшина – https://orcid.org/0000-0003-1708-5453; Р. А. Сюндюкова – https://orcid.org/0000-0001-5600-1967; И. Н. Дьяков – https://orcid.org/0000-0001-5384-9866; Л. В. Колобухина – https://orcid.org/0000-0001-5775-3343; И. С. Кружкова – https://orcid.org/0000-0002-4327-6985; Л. Н. Меркулова – https://orcid.org/0000-0002-7260-0879; М. Г. Русанова – https://orcid.org/0000-0001-6818-4107; Н. А. Антипят – https://orcid.org/0000-0001-8578-2838; С. В. Сметанина – https://orcid.org/0000-0003-3763-697X; Г. И. Каратаев – https://orcid.org/0000-0001-8771-6092.

Статья поступила: 10.02.2020. **Статья принята в печать:** 27.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. В связи с ростом лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых, распространением стертых форм и выявления бессимптомного носительства возбудителя возникла необходимость в создании новой вакцины против *B. pertussis*. На базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» была разработана противококлюшная вакцина, содержащая аттенуированные бактерии *B. pertussus*. В статье представлены данные по клиническому исследованию I фазы противококлюшной вакцины «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша» на здоровых добровольцах. По результатам исследования представлены данные о безопасности и переносимости интраназальной вакцины при первом применении у человека.

Цель. Изучение безопасности и переносимости вакцины «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша».

Материалы и методы. Добровольцы, изъявившие желание участвовать в исследовании, были проинформированы о его целях и задачах, условиях и требованиях к участникам, в том числе о критериях их включения/исключения из исследования. После подписания информированного согласия был проведён скрининг добровольцев на их соответствие критериям включения. Скрининговые исследования и оценку безопасности препарата ГамЖВК проводили на основании анамнеза, субъективных жалоб, оценки жизненно важных показателей, ЭКГ, пикфлоуметрии, результатов лабораторных исследований мочи и крови, иммуноферментного анализа сыворотки крови, анализа назофарингеальных аспиратов на наличие ДНК возбудителя коклюша, результатов физикального осмотра.

Результаты и обсуждение. В исследовании участвовали 36 «здоровых» добровольцев в возрасте 18–40 лет. Не выявлено нежелательных явлений (НЯ) достоверно связанных с применением ГамЖВК. Ни одна из использованных доз препарата не приводила к формированию местных и общих аллергических реакций на интраназальное введение ГамЖВК.

Заключение. Первая фаза слепого, плацебо-контролируемого клинического исследования показала безопасность и хорошую переносимость препарата ГамЖВК при назальном применении на здоровых добровольцах.

Ключевые слова: коклюш, клиническое исследование, противококлюшная живая вакцина, безопасность, переносимость.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Г. И. Каратаев, А. Ю. Медкова, Л. Н. Синяшина разработали дизайн протокола клинического исследования. А. А. Лиджиева, Л. В. Колобухина, И. С. Кружкова, Л. Н. Меркулова, Н. А. Антипят, С. В. Сметанина выполняли работы по клиническому исследованию. Г. И. Каратаев, А. Ю. Медкова, Г. Е. Семин, Л. Н. Синяшина, А. А. Лиджиева, Р. А. Сюндюкова проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Медкова А. Ю., Лиджиева А. А., Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Дьяков И. Н., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Антипят Н. А., Сметанина С. В., Каратаев Г. И. Клинические исследования безопасности и переносимости живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):114–119. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119

A Clinical Study of the Safety and Tolerability of Live Nasal Vaccines for the Prevention of Pertussis

Alisa Yu. Medkova[1], Alevtina A. Lidzhieva[1], Evgenij G. Semin[1], Lyudmila N. Sinyashina[1], Rezida A. Sioundioukova[1], Ilya N. Dyakov[2], Ludmila V. Kolobukhina[1], Irina S. Kruzhkova[1], Liliya N. Merkulova[1], Marina G. Rusanova[3], Natalia A. Antipyat[3], Svetlana V. Smetanina[3], Gennadij I. Karataev[1]*

© Медкова А. Ю., Лиджиева А. А., Сёмин Е. Г., Синяшина Л. Н., Сюндюкова Р. А., Дьяков И. Н., Колобухина Л. В., Кружкова И. С., Меркулова Л. Н., Русанова М. Г., Антипят Н. А., Сметанина С. В., Каратаев Г. И., 2021
© Medkova A. Yu., Lidzhieva A. A., Semin E. G., Sinyashina L. N., Sioundioukova R. A., Dyakov I. N., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Antipyat N. A., Smetanina S. V., Karataev G. I., 2021

1 – N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, 18, Gamalei str., Moscow, 123098, Russia
2 – Federal State Budgetary Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5a, Malyj Kazennyj lane, Moscow, 105064, Russia
3 – State Budgetary Healthcare Agency Infectious diseases clinical hospital No. 1 of the Moscow city health Department, 63, Volokolamskoe shosse, Moscow, 125310, Russia

***Corresponding author:** Gennadij I. Karataev. **E-mail:** karataevgi@rambler.ru

ORCID: Alisa Y. Medkova – https://orcid.org/0000-0002-1509-0622; Alevtina A. Lidzhieva – https://orcid.org/0000-0002-1537-6444; Evgenij G. Semin – https://orcid.org/0000-0001-6696-8362; Lyudmila N. Sinyashina – https://orcid.org/0000-0003-1708-5453; Rezida A. Sioundioukova – https://orcid.org/0000-0001-5600-1967; Ilya N. Dyakov – https://orcid.org/0000-0001-5384-9866; Ludmila V. Kolobukhina – https://orcid.org/0000-0001-5775-3343; Irina S. Kruzhkova – https://orcid.org/0000-0002-4327-6985; Liliya N. Merkulova – https://orcid.org/0000-0002-7260-0879; Marina G. Rusanova – https://orcid.org/0000-0001-6818-4107; Natalia A. Antipyat – https://orcid.org/0000-0001-8578-2838; Svetlana V Smetanina – https://orcid.org/0000-0003-3763-697X; Gennadij I. Karataev – https://orcid.org/0000-0001-8771-6092.

Received: 10.02.2020. **Revised:** 27.01.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Due to the growth of laboratory-confirmed cases of pertussis among adolescents and adults, the spread of latent form of disease and the identification of asymptomatic carriage of the pathogen, the need arose to create a new vaccine against *B. pertussis*. On the basis of N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, a pertussis vaccine, containing attenuated *B. pertussus* bacteria, was developed. The article presents data on a clinical trial of the first phase of the pertussis vaccine "GumGVK, live intranasal vaccine for the prevention of pertussis" in healthy volunteers. Based on the results of the study, data shows the safety and tolerability of the first intranasal vaccine using on humans.

Aim. To Study the safety and tolerability of the vaccine "GamGVK, live vaccine for intranasal use for the prevention of whooping cough»

Materials and methods. Volunteers who expressed a desire to participate in the study were informed about its goals and objectives, conditions and requirements for participants, including the criteria for their inclusion/exclusion from the study. After signing the informed consent, the volunteers were screened for their compliance with the inclusion criteria. Screening studies and safety assessment of the drug were performed on the basis of anamnesis, subjective complaints, assessment of vital signs, ECG, peak flowmetry, results of laboratory tests of urine and blood, enzyme immunoassay of blood serum, analysis of nasopharyngeal aspirates for the presence of pertussis pathogen DNA, results of physical examination.

Results and discussion. The study involved 36 "healthy" volunteers aged 18–40 years. The average age of the volunteers was 26.2 ± 5.5 years. Not reliably identified AES associated with the use of GumGVK. None of the used doses of the drug led to the formation of local and General allergic reactions to intranasal administration of GumGVK.

Conclusions. The drug GumGVK is safe for nasal use, has good tolerance.

Keywords: pertussis, live vaccine, anti-pertussis vaccine.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Gennadij I. Karataev, Alisa Yu. Medkova, Lyudmila N. Sinyashina developed the design of the clinical trial Protocol. Alevtina A. Lidzhieva, Ludmila V. Kolobukhina, Irina S. Kruzhkova, Liliya N. Merkulova, Natalia A. Antipyat, Svetlana V. Smetanina performed the work for a clinical trial. Gennadij I. Karataev, Alisa Yu. Medkova, Evgenij G. Semin, Lyudmila N. Sinyashina, Alevtina A. Lidzhieva, Rezida A. Sioundioukova participated in data interpretation. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Medkova A. Yu., Lidzhieva A. A., Semin E. G., Sinyashina L. N., Sioundioukova R. A., Dyakov I. N., Kolobukhina L. V., Kruzhkova I. S., Merkulova L. N., Antipyat N. A., Smetanina S. V., Karataev G. I. A clinical study of the safety and tolerability of live nasal vaccines for the prevention of pertussis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):114–119. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-114-119

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие отмечается значительный рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых [1–3], распространение стертых форм заболевания, выявлены бессимптомные носительства бактерий *B. pertussis* [2, 4, 5]. В США, где охват детей прививками АаКДС близок к 95 %, с начала 2000-х годов отмечен значительный рост регистрации коклюша, приближающийся к довакцинному периоду [6, 7]. Растёт заболеваемость в Италии и Англии [8, 9]. Отмечен рост числа регистрируемых случаев коклюша в Санкт-Петербурге и Москве на фоне сохранения уровня заболеваемости в России [10, 11]. В текущем году отмечен 30 % рост заболеваемости в сравнении с предыдущим годом.

Для профилактики коклюша в настоящее время в мире используют препараты АКДС-вакцины, содержащей корпускулярный коклюшный компонент (ККВ) или бесклеточный коклюшный компонент (БКВ) в сочетании с инактивированными дифтерийным и столбнячным токсинами, называемый АаКДС. Иногда ККВ или БКВ используют как моновакцины. Существуют поливакцины, содержащие помимо АКДС антиген гепатита В. Несмотря на высокую эффективность АКДС, содержащей ККВ, практика её использования выявила побочные эффекты, для устранения которых был предложен препарат БКВ, состоящий из нескольких очищенных антигенов коклюшного микроба. Считается, что БКВ менее токсична, но прямые исследования на приматах показали, что она не обеспечивает антибактерийного иммунитета и не защищает животных от экспериментальной коклюшной инфекции [12]. На невысокую эффективность ревакцинации подростков и взрослых БКВ указывают результаты определения ее эффективности при сравнительном определении заболеваемости вакцинированной и невакцинированной популяций [13, 14].

Другим важным недостатком современных коклюшных вакцин является невысокая длительность сформированного иммунитета. Опыт изучения эффективности противококлюшных вакцин различного ти-

па выявил, что длительность поствакцинального иммунитета не превышает 5–7 лет. После перенесенного заболевания напряженный иммунитет сохраняется до 15 лет [15].

Все современные коклюшные вакцины вводятся детям старше 2–3 месяцев не менее трёх раз. Таким образом, полный цикл вакцинации завершается не раньше, чем к 6 месячному возрасту ребёнка, что сохраняет высокий риск в первые, самые опасные для заболевания коклюшем месяцы его жизни.

Рост заболеваемости коклюшем, в том числе среди старших детей и взрослого населения, привёл к пониманию необходимости ревакцинации подростков и взрослых. Рассматривается необходимость вакцинации матерей и формирования «семейного иммунитета» [3, 4, 16, 17]. Для этих целей в настоящее время может быть рекомендована только БКВ, которая, как упомянуто выше, не обеспечивает защиту детей и взрослых от заражения и распространения инфекции и, следовательно, практически бесполезна для ревакцинации, основной целью которой является предотвращение распространения заболевания в популяции.

Таким образом, приходится констатировать, что, несмотря на целесообразность ревакцинации подростков и взрослых, в настоящее время отсутствует вакцина, приемлемая для этих целей. ККВ не рекомендована ВОЗ к применению у взрослых, а современная БКВ, рекомендованная для этих целей, скорее всего неэффективна. БКВ продемонстрировала свою эффективность и безопасность в качестве альтернативы ККВ для вакцинации младенцев. Такая вакцинация контролирует смертность и тяжесть заболевания детей младенческого, наиболее уязвимого для коклюша возраста. Однако, так же как и ККВ, она требует 3–4-кратной вакцинации и не защищает детей от повторного инфицирования и заболевания при незавершённом цикле вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Простое слепое исследование выполнено на основании разрешения Министерства здравоохранения № 895 от 28 декабря 2016 года. Участникам исследования, после добровольного подписания информированного согласия был проведён скрининг добровольцев на их соответствие критериям включения: мужчины/женщины в возрасте от 18 до 40 лет, с верифицированным диагнозом «Здоров», отсутствие специфических антител к возбудителю коклюша (отрицательный результат ИФА в соответствии с инструкцией производителя тест-системы для выявления антител к возбудителю коклюша) и ДНК *B. pertussis* в назофарингеальных мазках (методом ПЦР) и другим.

Обследование добровольцев в период скрининга проводили амбулаторно. Согласно дизайну исследования 36 отобранных добровольцев были разделены на три группы по 12 человек. Добровольцы каждой группы получали вакцину в дозах: $2{,}5 \times 10^8$ КОЕ (группа 1), 109 КОЕ (группа 2) и 4×10^9 КОЕ (группа 3). В каждую группу входили 3 добровольца, получивших плацебо. Включение добровольцев в исследование с эскалацией дозы препарата проводилось после оценки параметров безопасности и получения положительного решения независимого комитета по мониторингу данных об увеличении дозы. После однократного дозирования добровольцев период наблюдения составил 150 дней амбулаторно.

Препарат ГамЖВК и его применение. Исследуемый препарат ГамЖВК – лиофилизат аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS во флаконе. Плацебо – стерильный лиофилизат стабилизатора для последующего растворения в 0,9 % хлорида натрия для инъекций. Перед применением во флакон вводили раствор натрия хлорида 0,9 % в количестве 0,5–8,0 мл в зависимости от дозы.

Добровольцы принимали плацебо/исследуемый препарат в боксированном стационаре инфекционного отделения. Препарат вводился назофарингеально последовательно в каждый носовой ход с обязательным вздохом для лучшего усвоения. После введения доброволец находился в стационаре под наблюдением в течение 48 часов; для дальнейшей оценки безопасности, добровольцы приходили в клинический центр на амбулаторные приемы.

Количественное определение ДНК B. pertussis в заднеглоточных аспиратах методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для молекулярно-биологического анализа использовали ДНК, выделенную из смывов заднеглоточных мазков (аспиратов), которая отбиралась на каждом визите добровольца. Осадки препаратов после центрифугирования обрабатывали раствором гуанидина тиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы Promega (США) [12, 13]. Для определения количества геном-эквивалентов ДНК *B. pertussis* в заднеглоточных аспиратах использована разработанная и валидированная нами тест-система ПЦР-РВ [13].

Оценка безопасности и переносимости. Безопасность и переносимость оценивали на каждом визите добровольца на основании субъективных жалоб, изменений жизненно-важных показателей, ЭКГ, пикфлоуметрии, результатов лабораторных исследований мочи и крови, результатов физикального осмотра после подписания информированного согласия.

Аллергизирующую активность ГамЖВК оценивали путем определения IgE с помощью ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия) после однократной интраназальной вакцинации, анализа местных реакций и состояния здоровья добровольца, которые проводились при каждом визите добровольца.

Соответствие добровольцев критериям включения определяли по результатам сбора анамнеза и проведения лабораторных исследований.

Отсутствие специфических антител к возбудителю коклюша определяли с помощью ИФА в соответствии с инструкцией производителя тест-систем RIDASCREEN® Bordetella IgG (r-biopharm, Lot: 11037), RIDASCREEN® BordetellaIgM (r-biopharm, Lot: 12426), RIDASCREEN® BordetellaIgA (r-biopharm, Lot: 13316).

Возбудитель в носо-/ротоглотке добровольцев определяли с помощью метода ПЦР-РВ по разработанной методике из материала ротоглоточных тампонов.

Наличие антител к ВИЧ и вирусу гепатита С, наличие поверхностного антигена вируса гепатита В и возбудителя сифилиса определяли в клинической лаборатории с использованием сертифицированных методов и тест-систем.

Признаки алкогольной или наркотической зависимости определяли с помощью физикального обследования и анализа на присутствие продуктов метаболизма наркотических веществ в моче с помощью набора полосок «ИммуноХром-5-МУЛЬТИ-Экспресс» (ООО «МЕД-ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА», Россия) на амфетамин, марихуану, морфин, кокаин и метамфетамин.

Беременность, лактация (для женщин) определяли с помощью тест-полоски «FRAUTEST Express» по моче (AXIOM GmbH, Германия).

Функцию внешнего дыхания определяли с помощью пикфлоуметра MicroPeak (Великобритания) на скрининговом визите и через 24 часа после введения препарата.

Электрокардиографическое исследование выполняли на многоканальном (12 каналов), с автоматическим режимом, переносном электрокардиографе ЭК12Т «Альтон-106 Ц» (ООО «Альтомедика», Россия).

Определение параметров лабораторных исследований крови и мочи добровольцев проводили в лаборатории центра по сертифицированным методам в соответствии с утверждёнными инструкциями.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью описательной статистики и программного обеспечения GraphPad Prism. Нормальность распределения оценивали с помощью KS-теста. Учитывая, что распределение значений не соответствовало пуассоновскому на всех временных точках и численность групп составила 9 человек, для статистической обработки и оценки достоверности различий между значениями медианы IgE в группах использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Число и процент добровольцев с НЯ. Их связь с исследуемым препаратом и степень тяжести определяли в соответствии с CTCAE версия 4.03 [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Демографический состав добровольцев

В исследовании участвовали 36 «здоровых» добровольцев в возрасте 18–40 лет. Средний возраст добровольцев составил 26,2 ± 5,5 лет. Мужчин 44 %, женщин 56 %. Все добровольцы постоянно проживают в Москве или в Подмосковье.

Оценка аллергенности препарата ГамЖВК по уровню общего IgE

Уровень общего IgE в крови является относительным показателем, позволяющим оценить аллергенность исследуемого препарата. Иммуноглобулины этого класса играют важнейшую роль в инициации реакций гиперчувствительности немедленного типа. В качестве показателя, свидетельствующего об аллергенности вакцины, было принято кратное возрастание общего уровня IgE у вакцинированных пациентов в сравнении со значениями, выявленными на 0-е сутки (до введения препарата или плацебо) (рисунок 1).

Распределение значений IgE не соответствовало пуассоновскому на всех временных точках (согласно KS-тесту нормальности), в связи с чем для статистической обработки использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Как видно из приведенных данных различия в уровне IgE между группой плацебо и добровольцами, получившими максимальную дозу вакцины, явля-

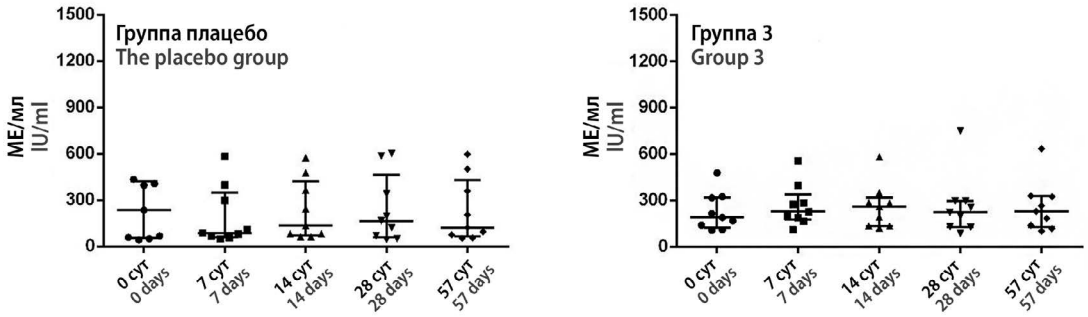


Рисунок 1. Уровни IgE в сыворотке крови добровольцев, получивших плацебо и максимальную дозу. В сравнении с исходным уровнем для группы плацебо на 7-е сутки p = 0,78, на 14-е сутки 0,78, на 28-е сутки p = 0,95, на 57-е сутки p = 0,98; для группы 3 p = 0,45, p = 0,65, p = 0,91, p = 0,75 соответственно

Figure 1. IgE levels in the blood serum of volunteers who received placebo 1A and the maximum dose. Compared with the baseline for the placebo group on the 7th day p = 0.78, on the 14th day 0.78, on the 28th day p = 0.95, on the 57th day p = 0.98; for group 3 p = 0.45, p = 0.65, p = 0.91, p = 0.75 respectively

ются недостоверными. Также не выявлено достоверного отличия в значениях IgE в крови добровольцев после введения разных доз вакцины (результаты не представлены). Полученные результаты, а также отсутствие местных и общих аллергических реакций свидетельствуют о том, что препарат ГамЖВК не обладает аллергизирующими свойствами.

Оценка безопасности и переносимости препарата ГамЖВК

При анализе раннего поствакцинального периода на трех дозах местных реакций не выявили ни у одного добровольца. Было зафиксировано одно нежелательное явление на максимальной дозе (4×10^9 КОЕ – 3 группа) в виде кратковременного повышения температуры тела до 37,1 °С (в точке «3 часа» после введения препарата), заложенности носа и недомогания. Отсутствие четких клинических признаков ОРВИ и наличие временной связи с приемом препарата позволяет, по формальному основанию, определить причинно-следственную связь между НЯ и приёмом препарата как «условную». Однако отсутствие местных аллергических реакций, изменения уровня IgE, а также несоответствие картины НЯ клиническим признакам инфекционного процесса при коклюше ставит под сомнение достоверность связи НЯ с применением препарата. Остальные выявленные НЯ носили транзиторный характер и относились к отклонениям от нормы в лабораторно-инструментальном обследовании, не имели нарастающего эффекта при эскалации дозы и были расценены как клинически не значимые по классификации CTCAE и не связанные с применением исследуемого препарата. Результаты анализа НЯ и их связи с приёмом препарата суммированы в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что при данном объёме выборки и большом числе измеряемых параметров хотя бы одно НЯ, обусловленное любым отклонением от нормы любого измеренного параметра, наблюдается почти у 96 % добровольцев, получивших ГамЖВК, и у 78 %, получивших плацебо. Различия числа НЯ, связанных с небольшими отклонениями некоторых лабораторных параметров, при данном объёме выборок (9 у плацебо и 27 у препарата) не позволяет сделать заключение об их достоверности.

Количественный анализ отклонений значений всех измеренных лабораторных параметров у вакцинированных добровольцев и в группе плацебо показал, что в большинстве случаев абсолютные значения отклонений не превышали нескольких процентов от границы нормы, а процент добровольцев с отклонением от нормы среди получивших вакцину ГамЖВК и плацебо отличался не более чем на 0,7–1,5 %. По 14 лабораторным показателям НЯ встречались либо только у добровольцев, получивших плацебо, и не наблюдались у получивших ГамЖВК, либо встречались в обеих группах с одинаковой частотой. Этот результат указывает на отсутствие статистически достоверной разницы в количестве НЯ в группе вакцинированных и плацебо и на отсутствие связи НЯ с препаратом. Наблюдение за каждым из добровольцев, включая случаи респираторных заболеваний и одного НЯ, условно связанного с кашлем, подтверждает справедливость сделанного вывода. Описанные НЯ не имели клинических последствий и трактовались ими как клинически не значимые по классификации CTCAE.

Таблица 1. Общее число добровольцев с нежелательными явлениями, вакцинированных различными дозами ГамЖВК, и их связь с препаратом

Table 1. Total number of volunteers with adverse events vaccinated with different doses of GumGVK and their relationship with the drug.

Параметр Parameter	Плацебо n = 9 Placebo n = 9		Группа 1 $2{,}5 \times 10^8$ Group 1 $2{,}5 \times 10^8$		Группа 2 10^9 Group 2 10^9		Группа 3 4×10^9 Group 3 4×10^9	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Добровольцы с НЯ Volunteers with AE	7	77,8	9	100,0	9	100,0	8	88,9
Добровольцы с СНЯ Volunteers with SAE	0	0	0	0	0	0	0	0
Добровольцы с НЯ «определенная» Volunteers with AE "defined"	0	0	0	0	0	0	0	0
Добровольцы с НЯ «вероятная» Volunteers with AE "probable"	0	0	0	0	0	0	0	0
Добровольцы с НЯ «возможная» Volunteers with AE "possible"	0	0	0	0	0	0	0	0
Добровольцы с НЯ «сомнительная» Volunteers with AE "questionable"	0	0	0	0	0	0	0	0
Добровольцы с НЯ «условная» Volunteers with AE "conditional"	0	0	0	0	0	0	1	11,1
Добровольцы с НЯ «не связано» Volunteers with AE "is not associated"	7	100,0	9	100,0	9	100,0	7	77,8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первая фаза клинического исследования, направленная на изучение безопасности и подбора дозы живой коклюшной вакцины интраназального применения для профилактики коклюша, проведённая на 36 здоровых добровольцах, не выявила нежелательных явлений, связанных с применением препарата. Отсутствие вакцинальных реакций (местные и общие) у 100 % здоровых добровольцев позволяет сделать заключение о хорошей переносимости пре-

парата ГамЖВК. С точки зрения переносимости и безопасности «ГамЖВК, живая вакцина интраназального применения для профилактики коклюша», максимальная из исследованных доз препарата, может быть использована на следующих этапах клинического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Locht C. Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? *J. of infection*. 2016;72:34–40. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.04.020.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(3):201–211. DOI: 10.1016/j.prrv.2008.05.010.
3. Wiley K. E., Zuo Y., Macartney K. K., McIntyre P. B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*. 2013;31(4):618–625. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.052.
4. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A. et al. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect DisJ*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10.1097/01.inf.0000258699.64164.6d.
5. Медкова А. Ю., Аляпкина Ю. С., Синяшина Л. Н., Амелина И. П., Алексеев Я. И., Каратаев Г. И., Боковой А. Г. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий *Bordetella pertussis*. *Детские инфекции*. 2010;9(4):19–22.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012;61(28):517–522.
7. Rosewell A., Spokes P. J., Gilmour R. E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull*. 2012;23(9-10):171–178. DOI: 10.1071/NB12086.
8. Gonfiantini M. V., Carloni E., Gesualdo F. et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Eurosurveillance*. 2014;19(40):20921. DOI: 10/2807/1560-7917.es2014.19.40.20921.
9. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Health Protection report. London. 2012;126(51). Available at: http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm#prtsss1211.
10. Иозефович О. В., Харит С. М., Каплина С. П., Гостев В. В., Сидоренко С. В., Калиногорская О. С, Кветная А. С., Тимофеева Е. В., Окунева М. А. Распространённость коклюша у длительно кашляющих детей 6–17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС-вакциной. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012;5(66):56–59.
11. Лобзин Ю. В., Харит С. М. Проблемы вакцинопрофилактики: краткая история, современное состояние и пути решения. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014;6:30–37.
12. Warfel J. M., Zimmerman L. I., Merkel T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(2):787–792. DOI: 10/1073/pnas.1314688110.
13. Kilgore P. E., Salim A. M., Zervos M. J., Schmitt H. J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Rev*. 2016;29(3):449–486. DOI: 10.1128/CMR.00083-15.
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(4):744–756. DOI: 10.1080/21645515.2016.1259780.
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F. et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine*. 2007;25(8):1390–1397. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.10.048.
16. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A. et al. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10/1097/01.inf.0000258699.64164.6d.
17. Tanaka M., Vitek C. R., Pascual F. B. et al. Trends in pertussis among infants in the United States. 1980–1999. *JAMA*. 2003;290(22):2968–2975. DOI: 10/1001/jama.290.22.2968.
18. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4 Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010). U.S. Department of health and human services.

REFERENCES

1. Locht C. Pertussis: Where did we go wrong and what can we do about it? *J. of infection*. 2016;72:34–40. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.04.020.
2. Wood N., McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev*. 2008;9(3):201–211. DOI: 10.1016/j.prrv.2008.05.010.
3. Wiley K. E., Zuo Y., Macartney K. K., McIntyre P. B. Sources of pertussis infection in young infants: a review of key evidence informing targeting of the cocoon strategy. *Vaccine*. 2013;31(4):618–625. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.052.
4. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A. et al. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect DisJ*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10.1097/01.inf.0000258699.64164.6d.
5. Medkova A. Yu., Alyapkina Yu. S., Sinyashina L. N., Amelina I. P., Alekseev Ya. I., Karataev G. I., Bokovoy A. G. The prevalence of subclinical forms of pertussis and analysis of phase states of bacteria *Bordetella pertussis*. *Detskie infekcii = CHILDREN INFECTIONS*. 2010;9(4):19–22. (In Russ.).
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pertussis epidemic – Washington, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2012;61(28):517–522.
7. Rosewell A., Spokes P. J., Gilmour R. E. NSW Annual vaccine-preventable disease report, 2011. *NSW Public Health Bull*. 2012;23(9-10):171–178. DOI: 10.1071/NB12086.
8. Gonfiantini M. V., Carloni E., Gesualdo F. et al. Epidemiology of pertussis in Italy: disease trends over the last century. *Eurosurveillance*. 2014;19(40):20921. DOI: 10/2807/1560-7917.es2014.19.40.20921.
9. Confirmed pertussis in England and Wales: data to end – November 2012. Health Protection report. London. 2012;126(51). Available at: http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/news5112.htm#prtsss1211.
10. Iozefovich O. V., Kharit S. M., Kaplina S. P., Gostev V. V., Sidorenko S. V., Kalinogorskaya O. S., Kvetnaya A. S., Timofeeva E. V., Okuneva M. A. *Rasprostranjonnost' kokljusha u dlitel'no kashljajushhih detej 6–17 let, privityh v rannem vozraste AKDS-vakcinoj* [The prevalence of pertussis in long coughing children 6–17 years old, vaccinated at an early age with DTP vaccine]. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika*. 2012;5(66):56–59. (In Russ.).
11. Lobzin Ju. V., Harit S. M., *Problemy vakcinoprofilaktiki: kratkaja istorija, sovremennoe sostojanie i puti reshenija* [Problems of Vaccine Prevention: A Brief History, Current State and Solutions]. *Èpidemiologiâ i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;6:30–37. (In Russ.).
12. Warfel J. M., Zimmerman L. I., Merkel T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(2):787–792. DOI: 10/1073/pnas.1314688110.
13. Kilgore P. E., Salim A. M., Zervos M. J., Schmitt H. J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Rev*. 2016;29(3):449–486. DOI: 10.1128/CMR.00083-15.
14. Chen Z., He Q. Immune persistence after pertussis vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(4):744–756. DOI: 10.1080/21645515.2016.1259780.
15. Guiso N., Njamkepo E., Vié le Sage F. et al. Long-term humoral and cell-mediated immunity after acellular pertussis vaccination compares favourably with whole-cell vaccines 6 years after booster vaccination in the second year of life. *Vaccine*. 2007;25(8):1390–1397. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.10.048.
16. Wendelboe A. M., Njamkepo E., Bourillon A. et al. Transmission of Bordetella pertussis to young infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(4):293–299. DOI: 10/1097/01.inf.0000258699.64164.6d.
17. Tanaka M., Vitek C. R., Pascual F. B. et al. Trends in pertussis among infants in the United States. 1980–1999. *JAMA*. 2003;290(22):2968–2975. DOI: 10/1001/jama.290.22.2968.
18. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4 Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010). U.S. Department of health and human services.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров[1]*, И. Е. Шохин[1], М. А. Токарева[2], О. А. Арчакова[1], Д. С. Богданова[1], А. В. Алешина[1], Н. С. Багаева[1], В. В. Давыданова[1]

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.

Статья поступила: 11.01.2021. **Статья принята в печать:** 12.02.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. В настоящее время физико-химические методы анализа активно используются для определения содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Особенно широкое распространение приобрела высокоэффективная жидкостная хроматография с различными способами детектирования. Одной из наиболее сложных практических задач является хроматографическое разделение так называемых слабоудерживаемых соединений – лекарственных веществ, плохо удерживаемых на хроматографической колонке. Одними из таких веществ являются валганцикловир и ганцикловир.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки использован способ осаждения ацетонитрилом.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,00–1000,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00–10000,00 нг/мл для ганцикловира в плазме крови. Аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения исследований фармакокинетики препаратов валганцикловира и ганцикловира.

Ключевые слова: валганцикловир, ганцикловир, 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, В. В. Давыданова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин отвечал за организационную часть исследования. 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. Определение валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):120–128. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128

Development and Validation of Valganciclovir and its Active Metabolite Ganciclovir Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS Method

Timofey N. Komarov[1]*, Igor E. Shohin[1], Margarita A. Tokareva[2], Olga A. Archakova[1], Dana S. Bogdanova[1], Alexandra A. Aleshina[1], Natalia S. Bagaeva[1], Veronika V. Davydanova[1]

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.

Received: 11.01.2021. **Revised:** 12.02.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. Currently, physicochemical methods of quantification are actively used to determine the content of drugs in biological fluids. High-performance liquid chromatography with various detection methods is particularly widespread. One of the most difficult practical tasks is the chromatographic separation of so-called poorly retained compounds – drug substances poorly retained on the chromatographic column. Valganciclovir and Ganciclovir are among such substances.

© Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Токарева М. А., Арчакова О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Давыданова В. В., 2021
© Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., 2021

Aim. The aim of this study is to develop a method for valganciclovir and ganciclovir in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS) for pharmacokinetic studies.
Materials and methods. Determination of valganciclovir and ganciclovir in plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by acetonitrile protein precipitation.
Results and discussion. This method was validated by next parameters: selectivity, matrix effect, calibration curve, accuracy, precision, recovery, lower limit of quantification, carry-over and stability.
Conclusion. The method of the determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 5.00–1000.00 ng/ml for valganciclovir and 50.00–10000.00 ng/ml for ganciclovir. Method could be applied to valganciclovir and ganciclovir determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: valganciclovir, ganciclovir, 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, Veronika V. Davydanova have developed and validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Shohin I. E., Tokareva M. A., Archakova O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Davydanova V. V. Development and validation of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(1):120–128. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-120-128

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время физико-химические методы анализа активно используются для определения содержания лекарственных веществ в биологических жидкостях. Особенно широкое распространение приобрела высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с различными способами детектирования. В зависимости от условий хроматографирования и используемого детектора возможно разделять и определять вещества с различными свойствами, что особенно эффективно для количественного определения близких по структуре веществ. Вместе с тем одной из наиболее сложных практических задач является хроматографическое разделение так называемых слабоудерживаемых соединений – лекарственных веществ, плохо удерживаемых на хроматографической колонке. С этой целью используются различные аналитические приёмы: применение гидрофильных колонок (например типа HILIC), ионообменных колонок, ион-парных реагентов в качестве элюентов. Однако использование данных подходов при применении масс-спектрометрического детектора, а также при определении лекарственных веществ в сложных биологических матрицах не всегда возможно и оправдано. Наглядно данную задачу можно рассмотреть на примере валганцикловира (ВАЛ) (valganciclovir (VAL) (рисунок 1) и ганцикловира (ГАН) (ganciclovir (GAN) (рисунок 2).

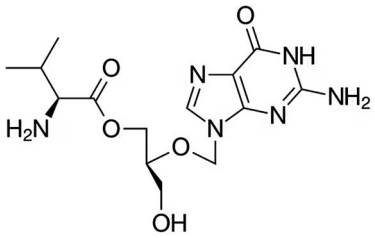


Рисунок 1. Структурная формула валганцикловира

Figure 1. Chemical structure of valganciclovir

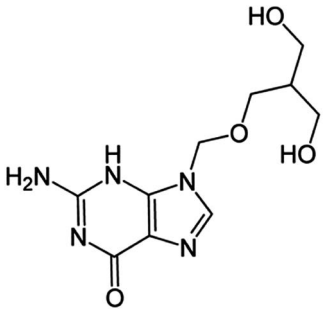


Рисунок 2. Структурная формула ганцикловира

Figure 2. Chemical structure of ganciclovir

Ганцикловир был разработан как препарат для терапии цитомегаловирусной инфекции, впоследствии было выявлено ингибирование *in vitro* других герпетических вирусов, включая вирус герпеса человека 1 и 2 типов, а также вирусов Эпштейна – Барр, ветряной оспы, герпеса человека 6 типа и обезьяньего вируса герпеса типа В [1]. Изначально в фармакотерапии использовался ганцикловир, однако его низкая биодоступность обуславливала необходимость внутривенного введения. Для повышения биодоступности было разработано пролекарство – *валганцикло-*

вир, превращающееся в процессе метаболизма в *ганцикловир*, который оказывает фармакологическое действие [2, 3].

Вместе с тем валганцикловир и ганцикловир, как и многие противовирусные лекарственные средства, обладают достаточно выраженными гидрофильными свойствами, что демонстрируют значения коэффициента распределения «октанол – вода» (log P) для данных веществ (таблица 1).

Таблица 1. Log P и pKa для валганцикловира, ганцикловира и ацикловира

Table 1. Log P and pKa for valganciclovir, ganciclovir and acyclovir

	Валганцикловир Valganciclovir	**Ганцикловир** Ganciclovir	**Ацикловир (внутренний стандарт)** Acyclovir (internal standard)
Log P	–0,81	–1,66	–0,95
pKa	10,16	8,71	11,98
Ссылка Reference	[4]	[5]	[6]

Основываясь на химических свойствах данных веществ, следует учитывать особенности хроматографического поведения, детектирования веществ, а также пробоподготовки. В литературных источниках приведены различные методики определения исследуемых веществ в биожидкостях при помощи метода ВЭЖХ в сочетании с осаждением 6%-м водным раствором хлорной кислоты и детектированием ультрафиолетовым детектором (УФ) [7], осаждением 50%-м водным раствором трифторуксусной кислоты с УФ-детектированием [8] для ганцикловира; осаждением ацетонитрилом и масс-спектрометрическим детектированием (МС) [9], а также осаждение ацетонитрилом с диодно-матричным детектированием [10] для валганцикловира. При этом следует отметить, что данные методики были приведены для определения только одного вещества: либо валганцикловира, либо ганцикловира. Ранее нами была разработана методика совместного определения для валганцикловира и ганцикловира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ [11]. Данная методика была единственной из описанных в научной литературе, которая позволяет одновременно определять валганцикловир и ганцикловир вышеуказанным методом. Однако при проведении исследований возникали дополнительные сложности, требовавшие использования специфической хроматографической колонки YMC-Pack Polyamine II и установления потока элюента на уровне 2 мл/мин, что значительно увеличивало расход реагента. Кроме того, для достижения оптимального разделения исследуемых веществ и внутреннего стандарта время анализа одного образца составляет 26 минут, что значительно увеличивает время исследования в целом.

Использование МС-детектирования позволяет достичь оптимального хроматографического разделения, при этом уменьшить скорость потока элюента и значительно сократить время анализа одного образца, что позволяет снизить затраты. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики определения валганцикловира и ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения ацетонитрилом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером и тандемным 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); ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция/Нидерланды/Израиль); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания); аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания); вода Milli-Q. Для приготовления исходных рабочих растворов были использованы стандартные образцы валганцикловира гидрохлорида (USP reference standard, количественное содержание 99,2 %), ганцикловира (USP reference standard, количественное содержание 97,5 %) и ацикловира (USP reference standard, количественное содержание 94,6 %).

Исходные стандартные растворы валганцикловира, ганцикловира и внутреннего стандарта (ВС) (internal standard (IS) ацикловира (АЦИ) (acyclovir (ACI) готовили путем растворения навески субстанций в метаноле; смешанные рабочие стандартные растворы валганцикловира и ганцикловира и рабочий раствор ВС ацикловира готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–9, а также уровням LLOQ (lower limit of quantification), L (low), M (middle) и H (high) (таблица 2).

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 200 мкл калибровочного образца, помещённого в центрифужные микропробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС ацикловира, затем прибавляли 600 мкл ацетонитрила, перемешивали на встря-

хивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, затем центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ на калибровочных уровнях

Table 2. Concentrations of analytes at calibration levels

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analityte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	ВАЛ VAL	ГАН GAN	АЦИ ACI
1	5,00	50,00	1000,00
2	10,00	100,00	1000,00
3	25,00	250,00	1000,00
4	50,00	500,00	1000,00
5	100,00	1000,00	1000,00
6	250,00	2500,00	1000,00
7	400,00	4000,00	1000,00
8	750,00	7500,00	1000,00
9	1000,00	10000,00	1000,00
LLOQ	5,00	50,00	1000,00
L	15,00	150,00	1000,00
M	500,00	5000,00	1000,00
H	800,00	8000,00	1000,00

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Хроматографическая колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: *элюент А*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде Milli-Q с прибавлением 0,08 % аммиака (по объёму); *элюент В*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды Milli-Q с прибавлением 0,08 % аммиака в ацетонитриле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы (ПФ) представлен в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока ПФ, мл/мин Mobile phase flow rate, ml/min
0,00	85,00	15,00	1,00
0,70	85,00	15,00	
3,50	90,00	10,00	
4,00	0,00	100,00	
5,50	0,00	100,00	
5,70	85,00	15,00	
7,00	85,00	15,00	

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,00 мин.
- Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °C, линия десольватации 200 °C, напряжение на капилляре +5,0 кВ.
- Режим ионизации: положительный.
- Условия детектирования валганцикловира: 355,20 m/z → 152,05 m/z.
- Условия детектирования ганцикловира: 255,80 m/z → 152,00 m/z; 255,80 m/z → 134,90 m/z.
- Условия детектирования ацикловира: 226,00 m/z → 152,00 m/z, 226,00 m/z → 134,95 m/z.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Особенностью разработки методики хроматографического разделения данных веществ является их слабое удерживание на «классических» колонках с октадецилсиликагелем. Использование колонки с привитыми аминогруппами также не привело к хорошему удерживанию и надлежащему разделению данных веществ. Были испытаны также колонки с октадецилсиликагелем, но с разным общим содержанием углерода (таблица 4).

Таблица 4. Некоторые свойства хроматографических колонок, использовавшихся в исследовании

Table 4. Some properties of chromatographic columns used in the study

Хроматографическая колонка Chromatographic column	Общее содержание углерода, % Total carbon content, %	Площадь поверхности, m^2/g Surface area, m^2/g
Phenomenex Luna C18(2) 50 × 2 mm, 5 µm	18,2	393
Phenomenex Luna NH2 50 × 3 mm, 5 µm	10,2	420
Waters XBridge C18 50 × 4,6 mm, 3,5 µm	18,0	178
YMC Hydrosphere C18 100 × 2 mm, 3 µm	12,2	330
Shim-pack GWS 150 × 4,6 mm, 5 µm	9,5	450

Наилучшие результаты были получены при использовании колонки Shim-Pack GWS с наименьшим общим содержанием углерода. Несмотря на незначительное удерживание исследуемых веществ на данной колонке, тем не менее хроматографические пики отделены от «мёртвого» объёма, а методика соответствует требованиям нормативной документации по валидационным параметрам, в том числе по параметру «селективность».

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств, том I [12], а также руководств

FDA [13] и EMA [14] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклами), прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами), степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность [стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналитов и ВС; краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналитов 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 валганцикловира 5,00 нг/мл и ганцикловира 50,00 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 исследуемых веществ и ВС, не превышают 20 % от сигнала на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала ВС соответственно. Соответствующая хроматограмма приведена ниже на рисунке 3.

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением смешанных рабочих стандартных растворов валганцикловира, ганцикловира и рабочего раствора ВС ацикловира без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения валганцикловира, ганцикловира и ацикловира из биологической матрицы.

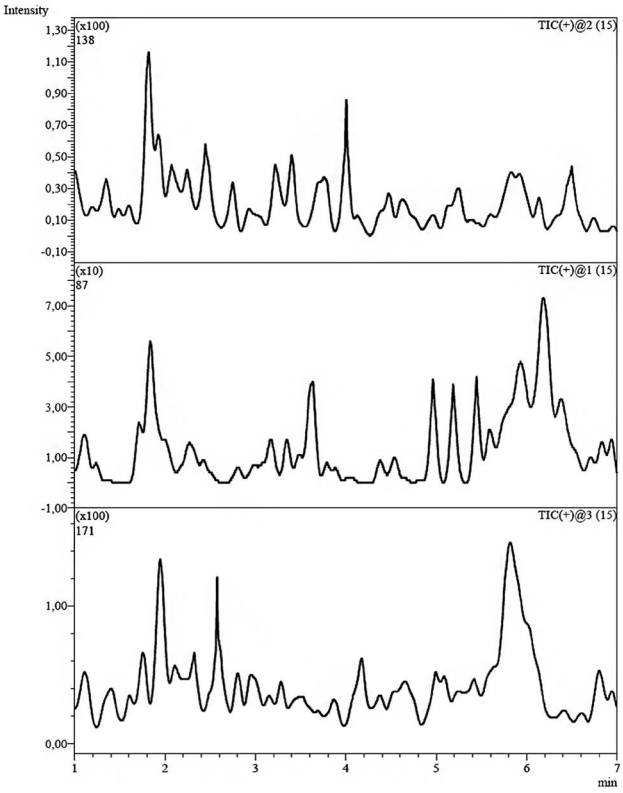


Рисунок 3. **Хроматограмма образца интактной плазмы крови**

Figure 3. **Blank plasma sample chromatogram**

Эффект матрицы был оценен на низком (уровень L) и высоком (уровень H) уровнях аналитических диапазонов концентраций валганцикловира и ганцикловира (таблица 2). Для ВС ацикловира эффект матрицы был рассчитан на уровне 1000,00 нг/мл. Данные представлены в таблицах 5 и 6.

Калибровочная кривая

Проводили анализ девяти образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС ацикловира и рабочих стандартных растворов вал-

Таблица 5. **Расчёт фактора матрицы валганцикловира, нормализованного по фактору матрицы ВС**

Table 5. **The matrix factor of valganciclovir calculations, normalized by the IS matrix factor**

№	Mf ВАЛ (уровень L) Mf of VAL (level L)	Mf АЦИ (уровень L) Mf of ACI (level L)	Нормализованный Mf (уровень L) Normalised Mf (level L)	Mf ВАЛ (уровень H) Mf of VAL (level H)	Mf АЦИ (уровень H) Mf of ACI (level H)	Нормализованный Mf (уровень H) Normalised Mf (level H)
1	0,91	1,00	0,90	1,00	0,99	1,01
2	0,87	1,00	0,87	0,99	1,02	0,97
3	0,91	1,01	0,90	0,98	0,99	0,99
4	0,92	1,02	0,91	1,01	1,01	1,00
5	0,90	0,99	0,91	0,99	1,02	0,97
6	0,94	1,01	0,93	1,01	1,02	0,99
Среднее Average			0,90	Среднее Average		0,99
CV, %			2,18	CV, %		1,50

Таблица 6. **Расчёт фактора матрицы ганцикловира, нормализованного по фактору матрицы ВС**

Table 6. **The matrix factor of ganciclovir calculations, normalized by the IS matrix factor**

№	Mf ГАН (уровень L) Mf of GAN (level L)	Mf АЦИ (уровень L) Mf of ACI (level L)	Нормализованный Mf (уровень L) Normalised Mf (level L)	Mf ГАН (уровень H) Mf of GAN (level H)	Mf АЦИ (уровень H) Mf of ACI (level H)	Нормализованный Mf (уровень H) Normalised Mf (level H)
1	1,18	1,00	1,17	1,04	0,99	1,04
2	0,98	1,00	0,98	0,82	1,02	0,81
3	0,97	1,01	0,97	0,84	0,99	0,85
4	1,14	1,02	1,12	0,99	1,01	0,98
5	1,29	0,99	1,30	0,85	1,02	0,84
6	1,21	1,01	1,19	1,00	1,02	0,98
Среднее Average			1,12	Среднее Average		0,92
CV, %			11,56	CV, %		10,58

ганцикловира и ганцикловира до концентраций, указанных в таблице 2 (уровни 1–9). По полученным значениям были построены калибровочный график в координатах отношение площади пика валганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации валганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови (рисунок 5), а также калибровочный график в координатах отношение площади пика ганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации ганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови (рисунок 6). Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Хроматограмма образца на уровне 9 (таблица 2) представлена на рисунке 4.

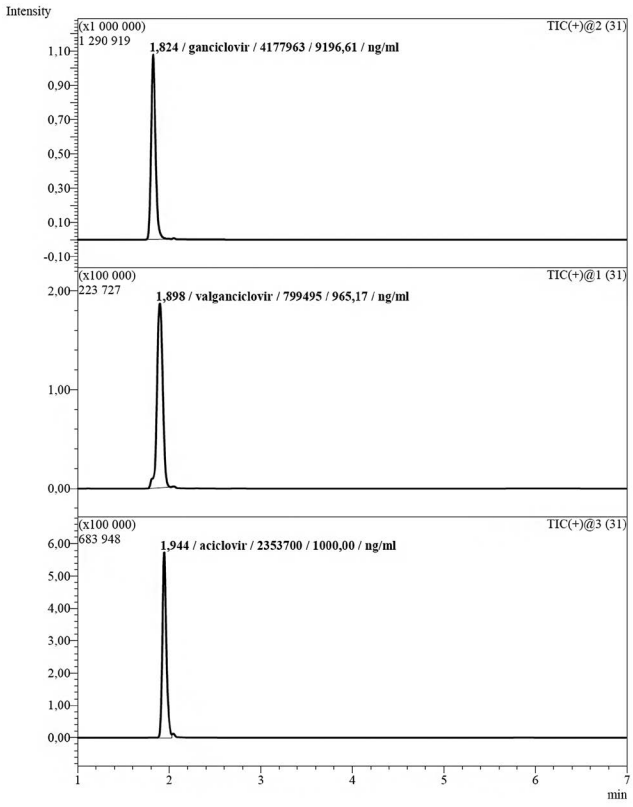


Рисунок 4. **Хроматограмма образца плазмы крови, уровень 9**

Figure 4. **Level 9 plasma sample chromatogram**

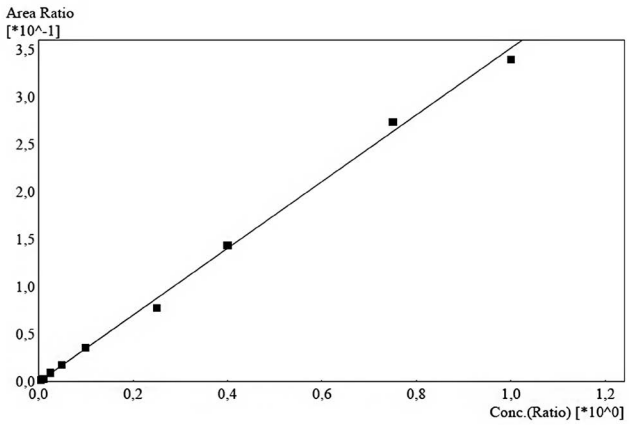


Рисунок 5. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика валганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации валганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови**

Figure 5. **The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of valganciclovir to acyclovir on the concentration ratio of valganciclovir to the acyclovir in plasma**

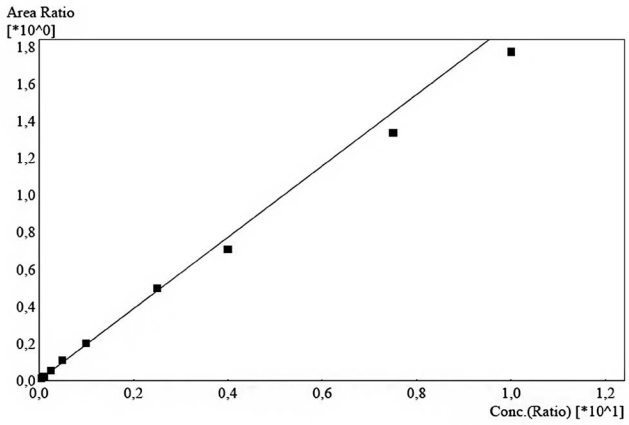


Рисунок 6. **Калибровочный график зависимости отношения площади пика ганцикловира к площади пика ацикловира от отношения концентрации ганцикловира к концентрации ацикловира в плазме крови**

Figure 6. **The calibration curve representing dependence of the ratio area peak of ganciclovir to the acyclovir on the concentration ratio of ganciclovir to the acyclovir in plasma**

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M и H (таблица 2). Анализ проводили в рамках 3 последовательностей по 5 образцов для каждого уровня. Точность и прецизионность были оценены внутри цикла, между двумя циклами и между тремя циклами, данные приведены в таблице 7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % для остальных точек).

Степень извлечения

Для оценки степени извлечения (СИ) анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной плазмы, без влияния степени извлечения на уровнях L, M, и H (таблица 2), 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.

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

НПКО методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За НПКО методики принималась минимальная концентрация валганцикловира и ганцикловира в плазме крови в аналитических диапазонах, для которых возможно количественное определение валганцикловира и ганцикловира со значениями RSD и *E* не более 20 %. НПКО составил 5,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00 нг/мл для ганцикловира. Хроматограммы плазмы крови с содержанием валганцикловира и ганцикловира на уровне НПКО приведена на рисунке 7. Предел обнаружения валганцикловира для данной методики составил около 0,93 нг/мл, а предел обнаружения ганцикловира – 0,73 нг/мл (отношение сигнал/шум 3,0).

Таблица 8. Оценка степени извлечения валганцикловира и ганцикловира на уровнях L, M, и H из различных биологических матриц

Table 8. Calculation of valganciclovir and ganciclovir recovery at L, M, H levels from different biological matrix

	СИ (уровень L), % Recovery (level L), %	**СИ (уровень M), %** Recovery (level M), %	**СИ (уровень H), %** Recovery (level H), %
Валганцикловир *Valganciclovir*			
Среднее Average	88,57	98,94	101,80
SD	6,78	2,76	2,48
RSD	7,66	2,79	2,43
Ганцикловир *Ganciclovir*			
Среднее Average	93,98	90,95	98,01
SD	8,64	9,83	4,44
RSD	9,20	10,80	4,53

Стабильность

Была подтверждена краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабиль-

Таблица 7. Точность и прецизионность методики

Table 7. Accuracy and precision of the method

Введено (нг/мл) Injected (ng/ml)	**Найдено (нг/мл), среднее значение** Average found, ng/ml			**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)**
Валганцикловир *Valganciclovir*												
5,00	5,80	5,45	5,29	0,08	0,62	0,56	1,37	11,35	10,53	16,08	8,96	5,89
15,00	14,46	14,08	13,72	0,62	0,75	0,80	4,26	5,31	5,86	–3,63	–6,11	–8,52
500,00	550,73	561,04	563,16	5,21	12,53	10,69	0,95	2,23	1,90	10,15	12,21	12,63
800,00	893,66	901,00	900,88	12,41	13,06	12,59	1,39	1,45	1,40	11,71	12,62	12,61
Ганцикловир *Ganciclovir*												
50,00	48,32	47,39	47,18	1,13	2,33	2,06	2,33	4,91	4,37	–3,35	–5,21	–5,65
150,00	145,73	143,35	141,91	6,62	6,30	5,73	4,27	4,39	4,04	–2,85	–4,44	–5,39
5000,00	4740,25	4808,83	4892,22	77,26	104,66	153,94	1,63	2,18	3,15	–5,19	–3,82	–2,16
8000,00	7198,32	7372,03	7482,18	146,29	225,72	252,41	2,03	3,06	3,37	–10,02	–7,85	–6,47

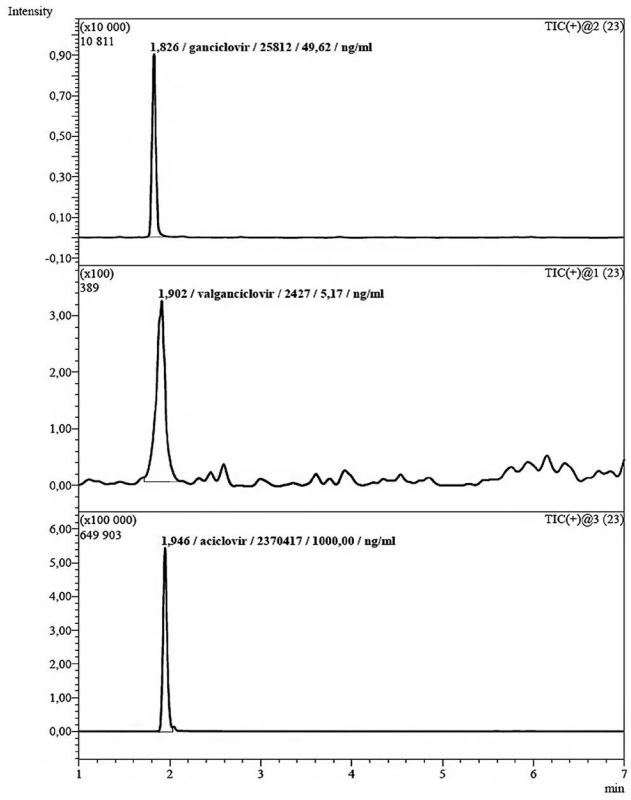


Рисунок 7. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень НПКО

Figure 7. LLOQ plasma sample chromatogram

ность стандартных растворов (при хранении в течение 30 дней при температуре –45 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 59 дней при температуре –45 °С) 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 исследуемых веществ и ВС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения валганцикловира, ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденные аналитические диапазоны методики составили 5,00–1000,00 нг/мл для валганцикловира и 50,00–10000,00 нг/мл для ганцикловира в плазме крови человека. Полученные аналитические диапазоны позволяют применять разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики валганцикловира и ганцикловира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпов И. А., Соловей Н. В. Валганцикловир как высокоэффективное лекарственное средство профилактикии терапии герпетических инфекций. *Медицинские новости*. 2018;3:56–59.
2. Xu H.-R., Li X.-N., Chen W.-L., Liu G.-Y., Chu N.-N., Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(2):329–334. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.053.
3. Singh O., Saxena S., Mishra S., Khuroo A., Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clinical Biochemistry*. 2011;44(10-11):907–915. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003.
4. Valganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01610.
5. Ganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01004.
6. Acyclovir [Internet]. DRUGBANK. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00787.
7. Teshima D., Otsubo K., Yoshida T., Itoh Y., Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2003;17(8):500–503. DOI: 10.1002/bmc.258.
8. Padullés A., Colom H., Armendariz Y., Cerezo G., Caldes A., Pou L., Torras J., Grinyó J. M., Lloberas N. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography–UV detection. *Clinical Biochemistry*. 2012;45(4-5):309–314. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.014.
9. Heinig K., Wirz T., Gajate-Perez A., Belli S. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(5-6):436–442. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.12.033.
10. Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. *Chromatographia*. 2007;66(1):25–30. DOI: 10.1365/s10337-007-0302-y.
11. Комаров Т. Н., Шохин И. Е., Мискив О. А., Богданова Д. С., Алешина А. В., Медведев Ю. В., Багаева Н. С. Разработка и валидация методики количественного определения валганцикловира и его метаболита ганцикловира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(2):133–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
12. Миронов А. Н., ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К; 2013. 280 с.
13. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
14. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.

REFERENCES

1. Karpov I. A., Salavei M. U. Valganciclovir as a highly effective drug for the prevention and treatment of herpes infections. *Meditsinskie novosti*. 2018;3:56–59. (In Belarus).
2. Xu H.-R., Li X.-N., Chen W.-L., Liu G.-Y., Chu N.-N., Yu C. A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(2):329–334. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.053.
3. Singh O., Saxena S., Mishra S., Khuroo A., Monif T. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by li-

quid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clinical Biochemistry*. 2011;44(10-11):907–915. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003.
4. Valganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01610.
5. Ganciclovir [Internet]. *DRUGBANK*. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB01004.
6. Acyclovir [Internet]. DRUGBANK. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00787.
7. Teshima D., Otsubo K., Yoshida T., Itoh Y., Oishi R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 2003;17(8):500–503. DOI: 10.1002/bmc.258.
8. Padullés A., Colom H., Armendariz Y., Cerezo G., Caldes A., Pou L., Torras J., Grinyó J. M., Lloberas N. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra performance liquid chromatography–UV detection. *Clinical Biochemistry*. 2012;45(4-5):309–314. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.014.
9. Heinig K., Wirz T., Gajate-Perez A., Belli S. Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(5-6):436–442. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.12.033.
10. Dogan-Topal B., Ozkan S. A., Uslu B. Simultaneous determination of abacavir, efavirenz and valganciclovir in human serum samples by isocratic HPLC-DAD detection. *Chromatographia*. 2007;66(1):25–30. DOI: 10.1365/s10337-007-0302-y.
11. Komarov T. N., Shohin I. E., Miskiv O. A., Bogdanova D. S., Aleshina A. V., Medvedev Yu. V., Bagaeva N. S. Development and Validation of Valganciclovir and its Active Metabolite Ganciclovir Determination in Human Plasma by HPLC-UV Method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(2):133–139. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-2-133-139.
12. Mironov A. N. *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for the examination of medicines]. V. II. Moscow: Grif i K; 2013: 280 p. (In Russ.).
13. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry.
14. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation.

XVI АПТЕЧНЫЙ САММИТ

Эффективное управление аптечной сетью

12 марта 2021 г., Москва

ОБЗОР РЫНКА 360°. Влияние пандемии на аптечный ритейл: какие ключевые отличия от первой волны?

РЕГУЛЯТОР И ВСЕ ВОКРУГ НЕГО: какие законодательные изменения определяют настоящее и будущее аптек?

ВЕСЬ РЫНОК НА ОДНОЙ ПЛОЩАДКЕ. Малые, средние и большие сети вместе ищут решения своих проблем

НОВЫЕ ФОРМАТЫ. Форсайт-сессия, блиц-интервью, дебаты, сторителлинг, брейншторминг. Самые жаркие дискуссии на самые важные темы

МОЩНЕЙШИЙ НЕТВОРК — это отличный шанс найти новые возможности для бизнеса, а также партнеров в индустрии

18+

реклама

Регистрация на сайте: **infor-media.ru**

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

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-130-135
УДК 614.2

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Развитие систем переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на предприятиях производства лекарственных средств стран ЕАЭС

В. А. Смирнов[1]*, В. В. Горячкин[1], В. Н. Шестаков[1], Р. А. Абрамович[2]

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6
2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

***Контактное лицо:** Смирнов Владимир А. **E-mail:** smirnovs3000@yandex.ru

ORCID: В. А. Смирнов – https://orcid.org/0000-0002-7206-3313; В. В. Горячкин – https://orcid.org/0000-0002-1069-8647; В. Н. Шестаков – https://orcid.org/0000-0002-7929-4982; Р. А. Абрамович – https://orcid.org/0000-0003-1784-881X.

Статья поступила: 02.11.2020. **Статья принята в печать:** 03.12.2020. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. В публикации рассмотрены состояние и проблемы переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на фармацевтических предприятиях стран ЕАЭС.

Цель. Целью исследования является комплексное изучение состояния и проблемы переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на предприятиях производства лекарственных средств стран ЕАЭС и разработка по его результатам научно-обоснованных рекомендаций по развитию соответствующих систем переподготовки персонала.

Материалы и методы. Методология исследования основана на комплексном анализе научной литературы зарубежных и отечественных авторов по вопросам фармацевтических систем качества и надлежащих производственных практик, управления рисками на фармацевтических производствах и персоналом при внедрении ФСК, аспектам обучения и переподготовки персонала.

Результаты и обсуждение. Доказано, что переподготовка кадров выступает важным фактором содействия внедрению ФСК на фармацевтических производствах. На примере компаний АО «Акрихин» и «OZON фармацевтика» рассмотрены аспекты передовых технологий развития систем переподготовки производственного персонала при внедрении ФСК. На основании синтеза теории и практики подготовлены практические рекомендации по внедрению и развитию целевых комплексных систем переподготовки персонала в контексте комплексного содействия внедрению ФСК на фармацевтических производствах на предприятиях в странах Евразийского Союза.

Заключение. Подтверждена ключевая роль системной и качественной переподготовки персонала в контексте комплексного содействия внедрению ФСК на фармацевтических и биофармацевтических производствах на предприятиях в странах ЕАЭС. Несмотря на многочисленные проблемы и противоречия, обусловливающие низкий уровень развития соответствующих систем переподготовки персонала, при реализации комплекса оптимизационных мер, такие системы могут успешно функционировать и обеспечивать заданный эффект, о чем свидетельствует изученный передовой опыт содействия внедрению ФСК на отдельных лидирующих предприятиях фармацевтической отрасли. Представленные авторами рекомендации по результатам проведенного исследования комплексно ориентированы на практическое внедрение в целях неуклонного совершенствования теории и практики переподготовки кадров фармацевтических производств в контексте внедрения ФСК.

Ключевые слова: фармацевтические системы качества, GMP, фармацевтическое производство, персонал фармацевтического предприятия, переподготовка персонала фармацевтического производства.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. А. Смирнов, В. В. Горячкин провели комплексный анализ научной литературы зарубежных и отечественных авторов. В. Н. Шестаковым, Р. А. Абрамович изучен и систематизирован опыт переподготовки производственного персонала на отечественных предприятиях АО «Акрихин» и «OZON фармацевтика».

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

Для цитирования: Смирнов В. А., Горячкин В. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А. Развитие систем переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на предприятиях производства лекарственных средств стран ЕАЭС. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):130–135. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-130-135

Development of Retraining Systems for the Implementation of the Pharmaceutical Quality System at Pharmaceutical Production Enterprises of the EAEU Countries

Vladimir A. Smirnov[1], Vyacheslav V. Goryachkin[1], Vladislav N. Shestakov[1], Rimma A. Abramovich[2]

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia
1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

***Corresponding author:** Vladimir A. Smirnov. **E-mail:** smirnovs3000@yandex.ru

ORCID: Vladimir A. Smirnov – https://orcid.org/0000-0002-7206-3313; Vyacheslav V. Goryachkin – https://orcid.org/0000-0002-1069-8647; Vladislav N. Shestakov – https://orcid.org/0000-0002-7929-4982; Rimma A. Abramovich – https://orcid.org/0000-0003-1784-881X.

Received: 02.11.2020. **Revised:** 03.12.2020. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. The publication discusses the state and problems of personnel retraining in the implementation of the pharmaceutical quality system at pharmaceutical enter-prises of the Eurasian Union (EU) countries.

© Смирнов В. А., Горячкин В. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А., 2021
© Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A., 2021

Aim. The aim of the study is to comprehensively study the state and problems of retraining of personnel in the implementation of the pharmaceutical quality system at the enterprises of the production of medicines in the EU countries, and the development, based on its results, of scientifically grounded recommendations for the development of appropriate personnel retraining systems.
Materials and methods. The research methodology is based on a comprehensive analysis of scientific literature of foreign and domestic authors on pharmaceutical quality systems and good manufacturing practices, risk management in pharmaceutical industries and personnel in the implementation of FQS, aspects of personnel training and retraining.
Results and discussion. It has been proven that retraining of personnel is an important factor in promoting the introduction of FQS in pharmaceutical industries. On the example of the companies Akrikhin JSC and OZON Pharmaceuticals, aspects of advanced technologies for the development of retraining systems for production personnel in the implementation of FQS are considered. Based on the synthesis of theory and practice, practical recommendations have been prepared for the implementation and development of targeted integrated systems for retraining personnel in the context of comprehensive assistance in the implementation of FQS in pharmaceutical industries at enterprises in the countries of the Eurasian Union.
Conclusion. The key role of systematic and high-quality retraining of personnel in the context of comprehensive assistance to the implementation of FQS in pharmaceutical and biopharmaceutical industries at enterprises in the EU countries was confirmed. Despite the numerous problems and contradictions that determine the low level of development of the relevant personnel retraining systems, meanwhile, when implementing a set of optimization measures, such systems can successfully function and provide the desired effect, as evidenced by the studied best practices in promoting the implementation of FQS at certain leading enterprises of the pharmaceutical industry. The recommendations presented by the authors based on the results of the study are comprehensively focused on practical implementation in order to steadily improve the theory and practice of retraining of pharmaceutical production personnel in the context of FQS implementation.

Keywords: pharmaceutical quality systems, GMP, pharmaceutical production, pharmaceutical personnel, retraining of pharmaceutical personnel.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Vladimir A. Smirnov, Vyacheslav V. Goryachkin, conducted a comprehensive analysis of the scientific literature of foreign and domestic authors. Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich studied and systematized the experience of retraining production personnel at the domestic enterprises of JSC "Akrikhin" and "OZON pharmaceuticals".

Acknowledgment. This work was supported by Program 5-100.

For citation: Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A. Development of retraining systems for the implementation of the phar-maceutical quality system at pharmaceutical production enterprises of the EAEU countries. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(1):130–135. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-130-135

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования связана с высокой значимостью скорейшего и результативного внедрения фармацевтических систем качества (далее – ФСК) на предприятиях по выпуску фармацевтической продукции стран Евразийского Союза (ЕАЭС). Нормативно-руководящую основу внедрения ФСК составляют правила надлежащей производственной практики [1].

Продолжительный успешный опыт внедрения ФСК на фармацевтических производствах на Западе [2] сигнализирует о том, что развитие управления качеством в условиях стран ЕАЭС поспособствует неуклонному обеспечению как нормативных, так и рыночных требований к безопасности и качеству выпускаемых лекарственных средств [3].

При этом одним из ключевых и малоизученных вопросов, связанных с внедрением ФСК на производствах лекарственных средств, выступает кадровое обеспечение и переподготовка кадров [4]. Системы переподготовки персонала фармацевтических производств по целому ряду причин находятся в неразвитом состоянии. Для их восстановления и перспективной трансформации в целях содействия внедрению ФСК требуется реализация комплекса мер, основанная на учёте опыта фармацевтических производств стран ЕАЭС [5].

Целью настоящей публикации является комплексное изучение состояния и проблем переподготовки кадров при внедрении фармацевтической системы качества на предприятиях производства лекарственных средств стран ЕАЭС и разработка по его результатам научно-обоснованных рекомендаций по развитию соответствующих систем переподготовки персонала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методология исследования основана на комплексном анализе научной литературы зарубежных и отечественных авторов по вопросам фармацевтических систем качества и надлежащих производственных практик, управления рисками на фармацевтических производствах и персоналом при внедрении ФСК, аспектам обучения и переподготовки персонала. Изучение и систематизация опыта переподготовки производственного персонала при внедрении ФСК на отечественных предприятиях проведены по материалам кейсов компаний-производителей АО «Акрихин» и «OZON фармацевтика». Авторы опирались на результаты проведенного лично опроса ключевого персонала по управлению качеством на фармацевтических производствах 12 предприятий – производителей ЕАЭС, включая шесть фармацевтических про-

изводств, а также на глубинный опрос руководящих работников упомянутых компаний АО «Акрихин» и «OZON фармацевтика», ответственных за переподготовку персонала в рамках ФСК и в соответствии с требованиями GMP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вопросы, связанные с внедрением фармацевтических систем качества на отечественных фармацевтических производствах в целом и тем более в сфере биофармацевтики, на сегодняшний день не получили комплексного научного освещения. Могут быть упомянуты лишь отдельные публикации [6, 7], наличие которых не ликвидирует потребности в релевантной информации. Более положительным в этой связи видится опыт украинских коллег [8].

Собственно, аспекты управления персоналом в рамках построения ФСК в научных источниках остаются и вовсе не раскрытыми ни в отечественной, ни в зарубежной исследовательской литературе [9]. Определенный практический интерес, прежде всего для целей научной идентификации отличительных особенностей управления персоналом на фармацевтических производствах, представляют публикации отраслевого характера [10, 11], между тем вопросы управления человеческими ресурсами фармацевтических производств в привязке к внедрению ФСК в литературных источниках не раскрыты.

Зарубежные исследователи обращают особое внимание на то, что кадровый аспект внедрения ФСК при производстве лекарственных средств является ключевым, на это же обращается внимание и в руководящих нормативных документах, в частности, Европейского Союза [12]. Значительный практический интерес приобретают исследования, связанные с методическими разработками по управлению профессиональной подготовкой и обучением производственного персонала фармацевтических предприятий.

Кадровые процессы внедрения ФСК на фармацевтических производствах, на предприятиях ЕАЭС имеют немало проблем и противоречий. Одна из ключевых проблем – кадровый голод, то есть хроническая нехватка работников надлежащей квалификации практически по всем должностям на всех стадиях производства. Причины сложившейся ситуации достаточно хорошо описаны в литературе [10], известны практикующим работникам и связаны, помимо прочего, с разрушением в 1990–2000-е годы сложившейся системы профессиональной подготовки работников фармацевтических производств без построения новых систем.

Как свидетельствует зарубежный опыт, на практике для работника производства, от рядового и линейного до руководящего, порой бывает крайне трудно сориентироваться в нюансах и аспектах ФСК [13]. Особую сложность могут представлять нормативно-методические указания и руководства, написанные сухим, инструктивным языком и ориентированные на широкое применение во всех сферах и на всех стадиях фармацевтического производства.

Следует к сказанному добавить, что на фармацевтических предприятиях ЕАЭС внедряются ФСК по европейским руководствам и стандартам.

По большому счету, такие руководства представляют собой специфические методические пособия, в которых информация раскрывается нелинейно, с множеством концентрированных материалов и последующим раскрытием, притом вовсе не обязательно в том же самом документе.

Новые знания должны получить апробацию в практической работе, когда при непосредственной вовлеченности работника производства в процессы функционирования ФСК сформируются уверенные навыки работы.

Приобретение таких навыков, их развитие неизбежным образом может быть реализовано исключительно посредством применения современных технологий переподготовки кадров.

Необходимость таковых обусловлена следующими обстоятельствами:

- общим несовершенством применяемых методик профессиональной подготовки и переподготовки работников фармацевтических производств;
- высокой вероятностью сопротивления изменениям со стороны персонала, опять же связываемой, помимо прочего, с нехваткой знаний, в том числе в сфере ФСК;
- кадровый голод как в части квалифицированных работников фармацевтических производств, так и в части квалифицированного педагогического состава. Наставники обучающих центров в сфере ФСК, помимо прочего, могут и должны готовиться из числа практических работников. Подобная конвергенция практикующего и обучающего персонала справедливо рассматривается в качестве источника развития корпоративных обучающих центров [11], однако на практике в изучаемой сфере подобная конвергенция отсутствует.

Представляется целесообразным рассмотреть материалы по переподготовке производственного персонала при внедрении ФСК в компаниях «Акрихин» и «OZON фармацевтика».

Аудиты, проводимые зарубежными партнерами, позволяют внедрять современные практики GMP и международный опыт, тем самым обеспечивая повышение качества выпускаемых лекарственных препаратов.

Важным аспектом внедрения ФСК в АО «Акрихин» стала разработка внутренней нормативно-методической документации, основу которой состав-

ляет стандартная операционная процедура, которая определяет порядок расчета показателей эффективности KPI-системы фармацевтического качества с целью подготовки ежемесячного сводного отчета качества (таблица 1).

Для целей совершенствования управления человеческими ресурсами фармацевтического производства в компании «Акрихин» реализуется цикл HR-процессов, который является показателем эффективности компании.

Цикл процессов включает в себя годовой обзор результатов работы, оценку соответствия ценностям компании, оценку потенциала и управление развитием, управление талантами. Все процессы автоматизированы в системе eHR. eHR – это электронная система компании «Акрихин», которая содержит необходимые инструменты управления эффективностью и развитием.

Обучение производственного персонала в компаниях «Акрихин» и «OZON фармацевтика» состоит из следующих базовых структурных компонентов: первичное обучение, повышение квалификации, освоение новой единицы оборудования и обучение смежной профессии. Общий период обучения профессии составляет 3–6 мес. и включает в себя закрепление, первичное и курсовое теоретическое обучение, практическое обучение и ознакомление с регламентирующей документацией, подготовку пробной квалификационной работы и прохождение квалификационного экзамена. В рамках подготовки производственных работников активно применяется система наставничества.

После завершения прохождения программы первичного обучения/повышения квалификации, обучения смежной профессии и сдачи экзамена с получением допуска к самостоятельной работе все навыки, освоенные на той или иной единице оборудования, заносятся в матрицу квалификаций.

На рисунке 1 представлена схема алгоритма передачи опыта по итогам внешнего обучения, реализованного в АО «Акрихин».

Организация обучения ФСК была осуществлена на основе каскадирования обучения: комплексное внешнее обучение проходит ключевой производственный персонал, затем осуществляется каскадное обучение работников внутри компании.

В перечень наиболее популярных тем обучения в АО «Акрихин» в сфере внедрения ФСК входят следующие темы: требования GMP, правила поведения персонала в чистых помещениях, личная гигиена,

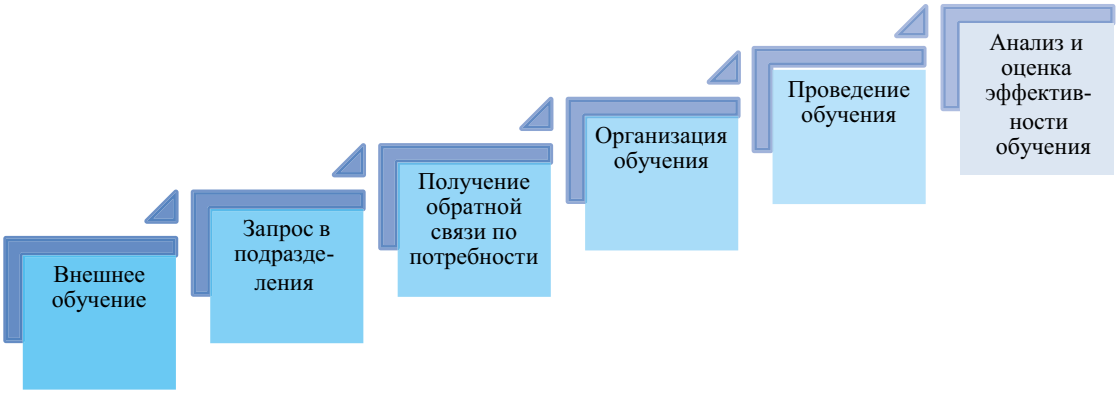


Рисунок 1. Алгоритм передачи опыта по итогам внешнего обучения производственного персонала ФСК/GMP

Таблица 1. Ключевые показатели эффективности (KPI), идентифицируемые по результатам аудита ФСК в АО «Акрихин»

Table 1. Key performance indicators (KPI) identified based on the results of the FGC audit in Akrikhin JSC

Показатели KPI Indicators KPI	2015		2016		2017		2018		2019	
	KPI факт KPI actual	Цель Aim	KPI факт KPI actual	Цель Aim	KPI факт KPI actual	Цель Aim	KPI факт KPI actual	Цель Aim	KPI факт KPI actual	Цель Aim
Серии с первого раза Episodes from the first try	98,78	97,5	98,4	97,5	99,06	97,5	99,13	97,5	99,06	97,5
Претензии на млн упаковок Claims for million packs	0,26	0,65	0,23	0,65	0,21	0,80	0,11	0,80	0,18	0,80
Уровень брака Defect level	0,27	0,60	0,14	0,50	0,05	0,30	0,17	0,30	0,13	0,30

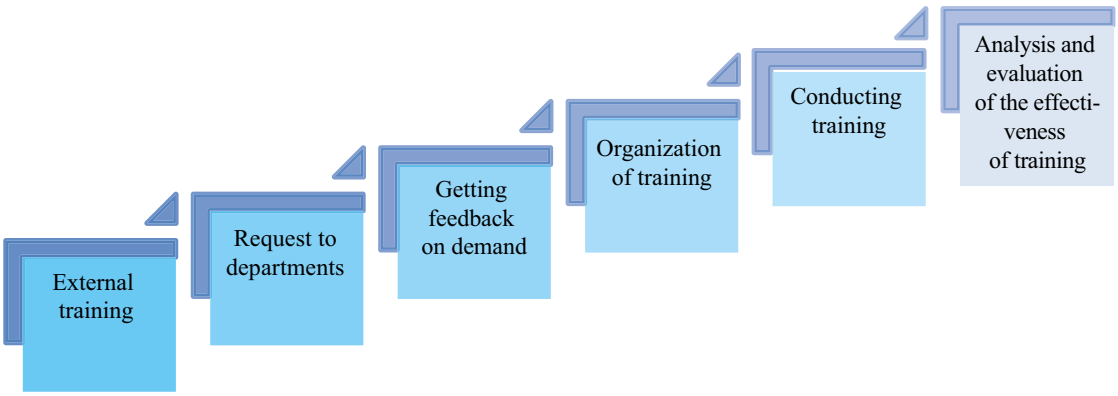


Figure 1. Algorithm for transferring experience based on the results of external training of FSK/GMP production personnel

целостность данных, правила надлежащей документальной практики.

В компании «OZON фармацевтика» реализовано общее внешнее обучение всех работников по базовым вопросам ФСК, специализированное внешнее обучение будущих корпоративных наставников по широкому кругу вопросов ФСК и наставничество внутри компании силами обученного ключевого персонала, которым охвачены все должности производственных работников, задействованных в формировании и функционировании ФСК.

На основе представленных материалов могут быть предложены следующие рекомендации по совершенствованию теории и практики переподготовки кадров в предметной области:

1) все акты внедрения ФСК должны сопровождаться реализацией комплексных программ переподготовки производственного персонала. Формальный подход к переподготовке недопустим;
2) основу переподготовки должны составлять специализированные образовательные программы. Обучающие программы могут быть дифференцированы по трем уровням – общему, специализированному и индивидуальному (для конкретной должности);
3) качественное обеспечение переподготовки кадров должно основываться на предварительном комплексном изучении компетенций и личностных качеств кандидата на переобучение;
4) процессы переподготовки кадров должны основываться на активном применении образовательных технологий, осуществляемом прежде всего в рамках контактной работы с преподавателями (наставниками) – индивидуальной и коллективной работы, деловых игр и кейс-стади, психологической работы с обучаемыми;
5) вопросы подготовки преподавателей (наставников) также должны реализовываться комплексно. В данном направлении должно формироваться явление, именуемое «тройной спиралью» [14] взаимодействия государства, науки и предпринимателей (компаний и корпораций фармацевтической отрасли).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования, подтверждена ключевая роль системной и качественной переподготовки персонала в контексте комплексного содействия внедрению ФСК на фармацевтических и биофармацевтических производствах на предприятиях в странах ЕАЭС. Несмотря на многочисленные проблемы и противоречия, обусловливающие низкий уровень развития соответствующих систем переподготовки персонала, при реализации комплекса оптимизационных мер такие системы могут успешно функционировать и обеспечивать заданный эффект, о чем свидетельствует изученный передовой опыт содействия внедрению ФСК на отдельных лидирующих предприятиях фармацевтической отрасли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евразийский экономический союз. Доступно по: http://www.eaeunion.org.
2. Chaudhari V., Yadav, V., Verma P., Singh A.A. Review on Good Manufacturing Practice (GMP) for Medicinal Products. *Pharma tutor*. 2014;2(9):8–19.
3. Нетёсов С. В. Федеральные инвестиции в биофармацевтику – залог биологической безопасности России. *Всероссийский экономический журнал ЭКО*. 2018;48(1):78–93.
4. Нестеренко Д. В. К вопросу о необходимости модернизация системы подготовки и переподготовки фармацевтических кадров. *Санкт-Петербургский образовательный вестник*. 2018;4:20–21.
5. Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России. Доступно по: https://gilsinp.ru/?page.
6. Обучение персонала на фармпроизводстве. Повышение квалификации сотрудников. [Презентация.] *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;2(19):52–54.
7. Lin L., Yue Y., Ye L. The study on the personnel qualification and training of chinese pharmaceutical factory. *Chinese pharmaceutical affairs*. 2009;12:9.

8. Моллах Хамид А., Лонг М., Бэйсмен Н. С. Управление рисками в фармацевтическом производстве. Перевод с английского. М.: *Группа компаний ВИАЛЕК*; 2014. 472 с.
9. Цхай А. А., Ананченко Ю. С., Жевнов Д. А., Рыков Д. А. Моделирование развития предприятий Алтайского биофармацевтического кластера. *Вестник Алтайской академии экономики и права*. 2010;2:73–77.
10. Прохорова М. В., Баранова А. А. Оптимальная структура денежной мотивации работников фармацевтического бизнеса. *Биофармацевтический журнал*. 2018;10(3):82–87.
11. Abdellah A., Noordin M. I., Ismail W. A. W. Importance and globalization status of good manufacturing practice (GMP) requirements for pharmaceutical excipients. *Saudi pharmaceutical journal*. 2015;23(1):9–13.
12. Измайлов А. М., Сараев А. Р. Персонал как фактор повышения конкурентоспособности фармацевтического предприятия. *Актуальные вопросы экономических наук*. 2012;26:287–291
13. Акрихин. Доступно по: http://www.akrikhin. ru.
14. Истомина С. В., Лычагина Т. А., Пахомова Е. А. Перспективы развития модели тройной спирали в России. *Национальные интересы: приоритеты и безопасность*. 2016;12(345):119–132

REFERENCES

1. Eurasian Economic Union. Available at: http://www.eaeunion.org. (In Russ.).
2. Chaudhari V., Yadav, V., Verma P., Singh A.A. Review on Good Manufacturing Practice (GMP) for Medicinal Products. *Pharma tutor.* 2014;2(9):8–19.
3. Netesov S.V. Federal investments in biopharmaceuticals are the key to biological safety of Russia. *Vserossijskij ekonomicheskij zhurnal EKO = All-Russian ECO Journal.* 2018;48(1):78–93. (In Russ.).
4. Nesterenko D. V. To the question of the need to modernize the system of training and retraining of pharmaceutical personnel. *Sankt-Peterburgskij obrazovatel'nyj vestnik*. 2018;4:20–21. (In Russ.).
5. State Institute of Drugs and Good Practices. Available at: https://gilsinp.ru/?page. (In Russ.).
6. Personnel training in pharmaceutical production. Professional development of employees. [Presentation.] *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;2(19):52–54. (In Russ.).
7. Lin L., Yue Y., Ye L. The study on the personnel qualification and training of chinese pharmaceutical factory. *Chinese pharmaceutical affairs*. 2009;12:9.
8. Mollah A. H., Long M., Baseman H.S. Risk management applications in pharmaceutical and biopharmaceutical manufacturing. Translation from English. Moscow: Group of companies "Vialek"; 2014. 432 p. (In Russ.).
9. Tskhai A. A., Ananchenko Y. S., Zhevnov D. A., Rykov D. A. Modeling the development of enterprises of the Altai biopharmaceutical cluster. *Vestnik Altajskoj akademii ekonomiki i prava*. 2010;2:73–77. (In Russ.).
10. Prokhorova M. V., Baranova A. A. The optimal structure of monetary motivation for pharmaceutical business employees. *Biofarmacevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2018;10(3):82–87. (In Russ.).
11. Abdellah A., Noordin M. I., Ismail W. A. W. Importance and globalization status of good manufacturing practice (GMP) requirements for pharmaceutical excipients. *Saudi pharmaceutical journal*. 2015;23(1):9–13.
12. Izmailov A. M., Saraev A. R. Personnel as a factor in increasing the competitiveness of a pharmaceutical company. *Aktual'nye voprosy ekonomicheskih nauk*. 2012;26:287–291. (In Russ.).
13. Akrikhin. Available at: http://www.akrikhin. ru. (In Russ.).
14. Istomina S.V., Lychagina T.A., Pakhomova E.A. The triple helix model: development prospects in russia. *Nacional'nye interesy: prioritety i bezopasnost' = National Interests: Priorities and Security*. 2016;12(345):119–132. (In Russ.).

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-136-141
УДК 615.1(075)

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Методические рекомендации по содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях ЕАЭС через управление вовлеченностью производственного персонала

В. А. Смирнов[1]*, В. В. Горячкин[1], В. Н. Шестаков[1], Р. А. Абрамович[2]

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6
2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

***Контактное лицо:** Смирнов Владимир А. **E-mail:** smirnovs3000@yandex.ru

ORCID: В. А. Смирнов – https://orcid.org/0000-0002-7206-3313; В. В. Горячкин – https://orcid.org/0000-0002-1069-8647; В. Н. Шестаков – https://orcid.org/0000-0002-7929-4982; Р. А. Абрамович – https://orcid.org/0000-0003-1784-881X.

Статья поступила: 15.12.2020. **Статья принята в печать:** 15.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Публикация посвящена актуальной организационно-кадровой проблематике внедрения фармацевтической системы качества (ФСК). Актуальность исследования обусловлена высокой значимостью обеспечения качества при разработке, производстве и выпуске в обращение лекарственных средств.

Цель. Целью исследования является разработка методических рекомендациий по организационно-кадровому содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях Евразийского союза (ЕАЭС) по выпуску лекарственных средств (ЛС) через инструментарий вовлеченности производственного персонала в развитие ФСК.

Материалы и методы. Вовлеченность персонала оценивалась на основании индекса вовлеченности; при изучении влияния вовлеченности производственного персонала на экономические показатели корпоративного развития использован метод бенчмаркинга (показатели вовлеченности и связанные с ними экономические показатели компаний «Акрихин», «Озон» сравнивались с панелью аналогичных показателей по 12 фармпредприятиям ЕАЭС).

Результаты и обсуждение. Констатируется важная роль обеспечения повышения вовлеченности производственного персонала в развитие ФСК как инструмента устойчивого обеспечения результативности внедрения ФСК и стандартов надлежащей производственной практики (GMP) на предприятиях по выпуску лекарственных средств. С учетом опыта формирования «кружков качества» в классическом японском менеджменте предложен инновационный инструментарий управления вовлеченностью производственного персонала, основанный на формировании сообществ работников, координации и управления их вовлеченностью и развитием через корпоративный портал фармацевтического предприятия, а также членство в закрытых клубах лидеров по качеству.

Заключение. Управление сообществами (малыми группами) производственных работников рассматривается как инструмент совершенствования организационно-кадрового обеспечения внедрения и совершенствования ФСК/GMP у фармпроизводителей ЕАЭС. Через сообщества предлагается осуществлять одновременно управление вовлеченностью, лояльностью и удовлетворенностью трудом производственного персонала; участники сообществ через обмен лучшими производственными практиками, идеями и мнениями по поводу развития ФСК и улучшения практик неуклонного обеспечения качества будут стимулировать себя и других производственных работников на неуклонное обеспечение качества выпускаемых ЛС. В качестве ожидаемого результата – неуклонный рост качества выпускаемых ЛС, приверженности производственного персонала философии качества, создание условий для роста производительности труда производственного персонала фармацевтических предприятий.

Ключевые слова: фармацевтическая система качества, надлежащие производственные практики, производственный персонал фармацевтических предприятий, вовлеченность производственного персонала, качество лекарственных средств.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. А. Смирнов, В. В. Горячкин провели комплексный анализ научной литературы зарубежных и отечественных авторов, провели анализ результатов проведенных инспекций иностранных производителей. В. Н. Шестаковым, Р. А. Абрамович был изучен и систематизирован опыт по внедрению фармацевтической системы качества на отечественных предприятиях АО «Акрихин» и «OZON фармацевтика».

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Программы 5-100.

Для цитирования: Смирнов В. А., Горячкин В. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А. Методические рекомендации по содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях ЕАЭС через управление вовлеченностью производственного персонала. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):136–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-136-141

Guidelines for Promoting the Implementation of Pharmaceutical Quality Systems at EAEU Enterprises Through the Management of the Engagement of Production Personnel

Vladimir A. Smirnov[1], Vyacheslav V. Goryachkin[1], Vladislav N. Shestakov[1], Rimma A. Abramovich[2]

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia
1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

***Corresponding author:** Vladimir A. Smirnov. **E-mail:** smirnovs3000@yandex.ru

ORCID: Vladimir A. Smirnov – https://orcid.org/0000-0002-7206-3313; Vyacheslav V. Goryachkin – https://orcid.org/0000-0002-1069-8647; Vladislav N. Shestakov – https://orcid.org/0000-0002-7929-4982; Rimma A. Abramovich – https://orcid.org/0000-0003-1784-881X.

Received: 15.12.2020. **Revised:** 15.01.2021. **Published:** 25.02.2021

© Смирнов В. А., Горячкин В. В., Шестаков В. Н., Абрамович Р. А., 2021
© Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A., 2021

Abstract

Introduction. The publication is devoted to the topical organizational and personnel issues of the implementation of the pharmaceutical quality system (PQS). The relevance of the study is due to the high importance of quality assurance in the development, production and release of drugs into circulation.

Aim. The aim: to develop guidelines for organizational and personnel assistance in the implementation of pharmaceutical quality systems at enterprises of the Eurasian Union (EAEU) for the production of medicines (drugs) through the toolkit for engaging production personnel in the development of PQS.

Materials and methods. Personnel engagement was assessed based on the engagement index; the benchmarking method was used when studying the impact of the engagement of production personnel on the economic indicators of corporate development (indicators of engagement and related economic indicators of "Akrikhin", "Ozon" were compared with a panel of similar indicators for 12 pharmaceutical enterprises of the EAEU).

Results and discussion. The important role of ensuring an increase in the engagement of production personnel in the development of PQS as a tool for sustainable provision of the effectiveness of the implementation of PQS and standards of good manufacturing practice (GMP) at drug production enterprises is stated. Taking into account the experience of forming quality circles in classical Japanese management, an innovative toolkit for managing the engagement of production personnel is proposed, based on the formation of employee communities, coordination and management of their engagement and development through the corporate portal of a pharmaceutical enterprise, as well as membership in closed clubs of 'quality leaders'.

Conclusion. Management of communities (small groups) of production workers is considered as a tool for improving the organizational and personnel support for the implementation and improvement of PQS / GMP at the EAEU pharmaceutical manufacturers. Through the communities, it is proposed to simultaneously manage the engagement, loyalty and job satisfaction of production personnel; community members, through the exchange of best manufacturing practices, ideas and opinions on the development of PQS and the improvement of nuclear quality assurance practices, will stimulate themselves and other production workers to consistently ensure the quality of manufactured drugs. The expected result is a steady increase in the quality of manufactured drugs, adherence of production personnel to the quality philosophy, creation of conditions for the growth of labour productivity of production personnel of pharmaceutical enterprises.

Keywords: pharmaceutical quality system, good manufacturing practices, production personnel of pharmaceutical enterprises, engagement of production personnel, quality of medicines.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Vladimir A. Smirnov, Vyacheslav V. Goryachkin conducted a comprehensive analysis of the scientific literature of foreign and domestic authors. They analyzed the results of inspections of foreign manufacturers. Vladislav N. Shestakov, Rimma A. Abramovich studied and systematized the experience of of implementing the pharmaceutical quality system at the domestic enterprises of JSC "Akrikhin" and "OZON pharmaceuticals".

Acknowledgment. This work was supported by Program 5-100.

For citation: Smirnov V. A., Goryachkin V. V., Shestakov V. N., Abramovich R. A. Guidelines for promoting the implementation of pharmaceutical quality systems at EAEU enterprises through the management of the engagement of production personnel. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):136–141. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-136-141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования обусловлена высокой значимостью обеспечения качества при разработке, производстве и выпуске в обращение лекарственных средств (ЛС). Универсальным инструментом в данной связи в международной практике выступает принятие разработчиком, производителем правил надлежащей практики (GxP, где GP – англ. *good practice*, надлежащая практика; x – сфера применения, например GMP – правила надлежащей производственной практики при выпуске лекарственных средств), разработка на их основе фармацевтической системы качества (ФСК), сертификация соответствия требованиям GxP и обеспечение комплексного мониторинга и контроля неуклонного соблюдения принятых обязательств и публичных требований. Важным аспектом функционирования ФСК выступает надлежащее организационное и кадровое обеспечение, включая, в частности, профессиональную подготовку всех категорий персонала по вопросам ФСК/GMP, формирование неуклонной приверженности работников идеям качества на фармацевтическом производстве, надлежащую мотивированность на обеспечение качества и др. [1]. В зарубежной управленческой практике и – постепенно – в российском опыте управления человеческими ресурсами решение соответствующего класса задач обеспечивается в том числе через управление вовлеченностью персонала в производственные (бизнес-) процессы, в корпоративное и личностное развитие [2–3].

На сегодняшний день формируются предпосылки для перехода всех производителей ЛС Евразийского экономического сообщества (ЕАЭС) на систему ФСК/GMP, между тем при реализации соответствующих мер фармацевтические производители на практике сталкиваются с многочисленными проблемами и противоречиями, в том числе организационного и кадрового плана. В настоящей публикации на основании систематизации результатов внедрения фармацевтических систем управления качества в ведущих компаниях отрасли, а также практического опыта работы авторов в системе GMP-инспектората подготовлены методические рекомендации по организационно-кадровому содействию внедрению

фармацевтических систем качества на предприятиях ЕАЭС по выпуску лекарственных средств через инструментарий вовлеченности производственного персонала в развитие ФСК.

Целью исследования является разработка методических рекомендаций по организационно-кадровому содействию внедрению фармацевтических систем качества на предприятиях Евразийского союза (ЕАЭС) по выпуску лекарственных средств (ЛС) через инструментарий вовлеченности производственного персонала в развитие ФСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование построено на основе диалектического подхода к изучению управленческих феноменов и применения системно-структурного, а также сравнительного методов познания. Для оценки состояния внедрения ФСК/GMP применены статистический метод и метод наблюдения. Эмпирические материалы представлены данными о внедрении ФСК на фармацевтических предприятиях «Акрихин», «Озон».

Вовлеченность персонала оценивалась на основании индекса вовлеченности по методике [4], адаптированной для случая вовлеченности персонала во внедрение ФСК/GMP авторами. Индекс вовлеченности оценивался в диапазоне от 0 до 100 баллов, где низкому уровню вовлеченности соответствует показатель от 0 до 20 баллов, высокому – от 80 до 100 баллов, с градацией уровней вовлеченности в соответствии с принципами построения шкалы Лайкерта на 5 категорий. Оценка вовлеченности проводилась подразделениями фармацевтических предприятий по управлению человеческими ресурсами, ассесмент-центром в январе-апреле 2020 года.

При изучении влияния вовлеченности персонала на экономические показатели корпоративного развития использован метод бенчмаркинга (показатели вовлеченности персонала и связанные с ними экономические показатели компаний «Акрихин», «Озон» сравнивались с панелью аналогичных показателей по 12 предприятиям ЕАЭС по выпуску ЛС на основе данных, представленных авторам по запросу либо полученных в ходе инспекторской деятельности).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее десятилетие наблюдается активное внедрение ФСК на предприятиях ЕАЭС по выпуску лекарственных средств. Обеспечение соответствия требованиям ФСК/GMP постепенно становится нормой деловой практики на фармацевтических производствах [5], кроме того, наличие сертификации системы качества справедливо рассматривается как положительный фактор потребительского выбора, поэтому активно используется в связях с общественностью и в продвижении бренда фармацевтических производителей.

Опыт работы авторов в сфере GMP-инспектората подтверждает существенный прогресс в сфере обеспечения качества производимой фармацевтической продукции, наблюдаемый по результатам проведения контрольно-проверочных мероприятий. Между тем, безусловно, имеются резервы для совершенствования, в том числе по следующим, достаточно распространенным причинам:

- отсутствие надлежащего опыта внедрения ФСК, а также недостаточно эффективная адаптация зарубежного опыта в данной сфере;
- нехватка квалифицированного персонала, недостаточный уровень подготовки персонала по вопросам ФСК/GMP (следует отметить, что буквально несколько лет назад, в начале – средине 2010-х годов, в Российской Федерации в принципе отсутствовала система подготовки персонала по вопросам ФСК/GMP, причем не только линейных производственных работников, но, что более важно, ключевого персонала, ответственного собственно за внедрение ФСК);
- недостаточная вовлеченность персонала в идеологию ФСК и ее внедрение на производстве (под вовлеченностью следует понимать комплексный показатель, замеряющий состояние корпоративной культуры компании и потенциал ее развития за счет неравнодушия персонала к своей работе и к делам компании, в которой они работают [6]).

Не выделяя ни одной из перечисленных проблем приоритета, предлагаем рассмотреть вопросы, связанные с вовлеченностью персонала во внедрение ФСК, поскольку, как показывают релевантные научные исследования [7–9], через инструментарий вовлеченности можно решить задачи мотивации, индивидуальной и коллективной ответственности, повышения качества проходимого обучения и повышения квалификации персонала и др.

При оценке состояния внедрения ФСК нами рассмотрены кейсы отечественных производителей – компаний «Акрихин» (Московская область) и «Озон» (Самарская область). На обоих фармацевтических предприятиях внедрена и сертифицирована GMP, отличие заключается прежде всего в более раннем периоде внедрения ФСК/GMP в компании «Акрихин» (конец 2000-х годов), а также в аффилированности данной компании с зарубежными инвесторами, по инициативе которых проводились первичные мероприятия по формированию фармацевтической системы качества и воплощению ее идеологии в практическую жизнь.

Изменения интегрального показателя эффективности ФСК и потребительской оценки качества выпускаемых ЛС по обеим анализируемым компаниям в графическом виде представлены на рисунках 1 и 2.

Как видим, налицо улучшение показателей KPI (интегральный показатель качества, исчисляемый в диапазоне от 0 до 1 и включающий в себя взвешенные оценки таких параметров качества, идентифицируемых в хода аудита качества, как серии, выпущенные с первого раза; число претензий на миллион упаковок;

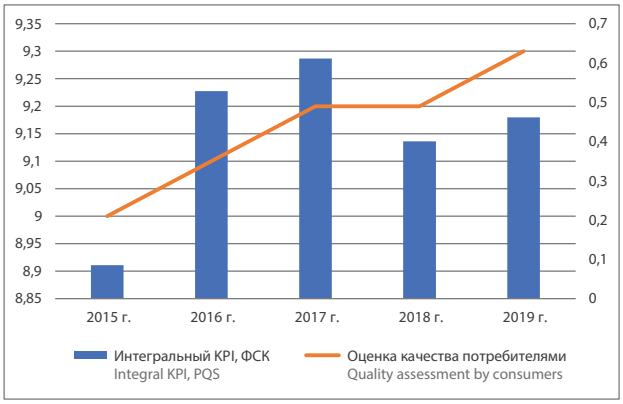


Рисунок 1. Динамика интегрального показателя эффективности ФСК и потребительской оценки качества выпускаемых ЛС АО «Акрихин» за 2015–2019 гг.

Figure 1. Dynamics of the integrated performance indicator of PQS and consumer assessment of the quality of manufactured medicines of Akrikhin JSC for 2015–2019

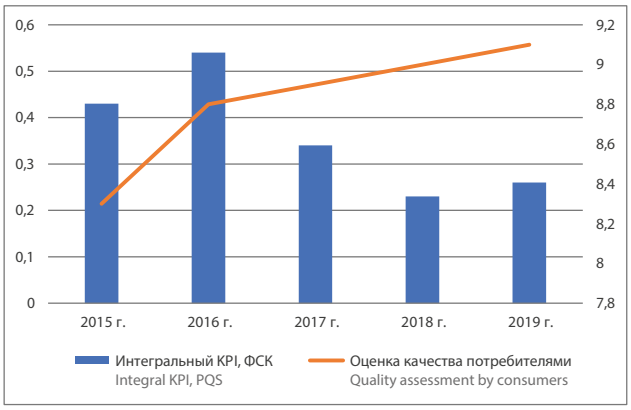


Рисунок 2. Динамика интегрального показателя эффективности ФСК и потребительской оценки качества выпускаемых ЛС компании «Озон» за 2015–2019 гг.

Figure 2. Dynamics of the integrated performance indicator of PQS and consumer assessment of the quality of manufactured medicines of the company "Ozon" for 2015–2019

число отозванных продуктов и серий; себестоимость и уровень брака), пики которого приходились на периоды активизации внедрения новых решений и мер в сфере ФСК, обеспечивающих неуклонный рост доверия потребителей к качеству фармацевтической продукции с фиксированием на уровне выше 9 баллов из 10 возможных (очень высокий). Отметим, что все положительные значения интегрального показателя эффективности ФСК рассматриваются как улучшения, поскольку сам интегральный показатель оценивается через отклонения от целевых значений.

В результате можно констатировать, что меры по развитию ФСК в обеих проанализированных компаниях обеспечили неуклонный рост качества фармацевтической продукции и усиление его положительного восприятия потребителями.

Между тем из анализа представленных материалов становится очевидным наличие потенциала по повышению качества производимых ЛС как в контексте потребительской удовлетворенности, так и интегральной оценки KPI.

Констатируя наличие дальнейших резервов совершенствования ФСК на двух предприятиях, обратим внимание на показатели вовлеченности персонала в производственные процессы (рисунок 3).

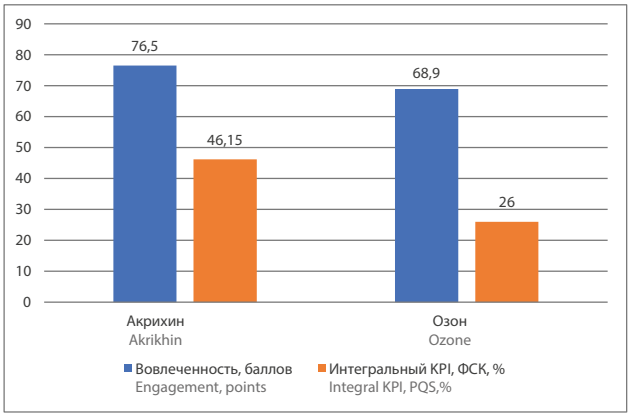


Рисунок 3. Показатели вовлеченности производственного персонала фармпредприятий в развитие ФСК баллов

Figure 3. Indicators of involvement of production personnel of pharmaceutical enterprises in the development of PQS, points

Таким образом, можно говорить о том, что резервы вовлеченности персонала в целом совпадают с резервами роста качества фармацевтической продукции. При этом по результатам бенчмаркинга можно сделать следующие выводы:

- средний уровень вовлеченности производственного персонала оценивается в 83,2 балла, однако варьирует существенно;
- одним из лидеров в сфере вовлеченности производственного персонала является компания «Акрихин», при этом необходимо отметить наличие комплексной работы по управлению развитием персонала, производимой в данной компании в контексте реализации ФСК и ее принципов, заложенных в GMP. В частности, проводится системное управление деловым (профессиональным) и личностным развитием производственных работников, выстроена многоуровневая система наставничества и профессионального обучения, контролируются удовлетворенность трудом и состояние личностной мотивации. Несмотря на то, что указанные инструменты влияют на вовлеченность персонала в ФСК косвенно, со всей очевидностью можно констатировать факт достижения ими целей и задач по данному направлению;

- компании с высокой оценкой вовлеченности (верхний квартиль) получают в 2 раза больше чистой прибыли, чем компании нижнего квартиля;
- сотрудники таких компаний демонстрируют производительность на 59 % выше, чем сотрудники компаний нижнего квартиля;
- компании верхнего квартиля демонстрируют рост выручки в 2,5 раза выше компаний нижнего квартиля;
- текучесть персонала в компаниях с высокой вовлеченностью ниже на 40 %, а удовлетворенность клиентов выше на 12 % в сравнении с компаниями с низкой вовлеченностью персонала.

Анализ теоретических положений и фактического состояния управления вовлеченностью производственного персонала фармацевтических компаний в целях содействия внедрению ФСК/GMP, в сочетании с возможностями влияния на процессы, позволяют констатировать, что основным инструментом управления в целях решения заявленной проблемы выступает совершенствование нематериального стимулирования.

В связи с этим для практического использования фармацевтическими компаниями авторами предлагаются инновационные технологии (инструмент) – Сообщества производственного персонала – с управлением и коммуникациями в закрытом (внутреннем) разделе корпоративного портала (сайта). В связи с эти предлагается:

- управление малыми Сообществами производственного персонала с коммуникациями в разделе на корпоративном портале;
- допуск лучших участников Сообщества в закрытые «клубы качества»;
- обеспечение прозрачности карьерных и профессиональных траекторий через личный кабинет участников Сообщества на корпоративном сайте: состояние, цели и задачи; прогресс и необходимые действия.

Развитие ФСК через управление сообществами объясняется тем, что формирование и деятельность малых групп – профессиональных сообществ – позволят получить ожидаемый результат через рост вовлеченности производственного персонала одновременно в развитие фармацевтических компаний и систем качества, а также в собственное развитие.

Управление Сообществами производственного персонала предполагает следующий механизм (за основу взят японский опыт «кружков качества», доказавший свою эффективность на протяжении более полувека в части неуклонного обеспечения качества на производстве любого типа [10]):

- формирование Сообщества производственного персонала (малой группы численностью 10–15 чел.) с инструментом коммуникаций на корпоративном портале с участием: работников; администратора Сообщества (тим-лидера);
- члены Сообщества выкладывают на портале лучшие практики, предложения по внедрению ФСК и инструментов совершенствования качества, обмениваются информацией, делятся информацией о профессиональном развитии;
- через портал осуществляется психологическое содействие (со стороны тим-лидера, специалистов по управлению человеческими ресурсами), включая важное с психологической точки зрения общение между участниками Сообщества;
- производственные работники, стремящиеся развиваться в профессиональном и карьерном плане, при достижении поставленных целей могут быть приняты в закрытые «клубы качества» – особые разделы Сообщества. Клубы будут иметь закрытые разделы на корпоративном портале, члены Клуба будут иметь доступ в клубный чат в известном мессенджере. Клубы являются гибкими инструментами; предполагается развитие Клубов через принятие новых участников. При этом работник, ставший членом закрытого «клуба качества», сразу получает бесценное ощущение собственной элитарности, причастности к числу лидеров перемен, что само по себе дает толчок двигаться дальше, развиваться и своим примером заинтересовывать все большее число других работников. Закрытые клубы также должны функционировать на основании внутренних норм и правил; атмосферу элитарности и глубокой сопричастности к результатам будет дополнять разработка внутренних традиций, назначение Хранителя традиций и др.

Важнейшим инструментом управления Сообществом выступает разработка и закрепление норм и правил.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как было выявлено, резервы вовлеченности производственного персонала в развитие ФСК/GMP в целом совпадают с резервами роста качества фармацевтической продукции. В условиях фактического отсутствия целевого управления вовлеченностью персонала на фармацевтических производствах ЕАЭС должны внедряться инновационные технологии, включая рекомендуемые нами профессиональные сообщества, философия которых построена на идеологии «кружков качества», заимствованных из классического японского менеджмента.

Мероприятия по повышению вовлеченности производственного персонала фармацевтических предприятий по выпуску ЛС в формирование и развитие ФСК/GMP фокусируются на создании Сообществ профессионалов и закрытой корпоративной группы производственных работников, обмене информацией и коммуникациями на корпоративном портале фармацевтической компании. Ожидаемые положительные результаты в контексте влияния на результативное внедрение и функционирование ФСК/GMP основываются на следующих постулатах:

1. Через Сообщества/Клубы осуществляется одновременно управление вовлеченностью, лояльностью и удовлетворенностью трудом производственного персонала.
2. Участники равняются на лучших в Сообществе/Клубе, обмениваются лучшими производственными практиками, идеями и мнениями по поводу развития ФСК и улучшения практик неуклонного обеспечения качества. Участники сообщества видят прогресс в выполнении поставленных целей развития, в конечном итоге подталкивают друг друга к росту и успеху, формируя расширенные предпосылки для устойчивого роста качества производственных процессов и выпускаемой продукции.
3. В результате повышается качество выпускаемых ЛС, растет приверженность производственного персонала философии качества, создаются условия для роста производительности труда.

Таким образом, управление Сообществами (малыми группами) производственных работников следует рассматривать как важный и действенный инструмент совершенствования организационно-кадрового обеспечения внедрения и совершенствования ФСК/GMP на фармацевтических предприятиях ЕАЭС по выпуску лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pai D. R., Kamath K., Subramanyam E. V., Shabaraya A. R. Personnel Training for Pharmaceutical Industry. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2016;7(03):55–61.
2. Lawler E. E. Total quality management and employee involvement: are they compatible? *Academy of Management Perspectives*. 1994;8(1):68–76. DOI: 10.5465/ame.1994.9411302396.
3. Neirotti P. Work intensification and employee involvement in lean production: New light on a classic dilemma. *The International Journal of Human Resource Management*. 2020;31(15):1958–83. DOI: 10.1080/09585192.2018.1424016.
4. Sorenson S. How employee engagement drives growth. *Gallup business journal*. 2013;1:1–4.
5. Gildeeva G. N., Belostotskiy A. V., Andreeva D. M. Relevant Changes in the Pharmacovigilance System in Russia and the Eurasian Economic Union (EAEU) *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2019;10(03):34–37.
6. Macey W. H., Schneider B. The meaning of employee engagement. *Industrial and organizational Psychology*. 2008;1(1):3–10. DOI: 10.1111/j.1754-9434.2007.0002.x.
7. Chiarini A. Relationships between total quality management and Six Sigma inside European manufacturing companies: a dedicated survey. *International Journal of Productivity and Quality Management*. 2013;11(2):179–194. DOI: 10.1504/IJPQM.2013.052023.
8. Bouwman-Boer Y., Andersen L. M. Pharmaceutical quality systems. In: Bouwman-Boer Y., Fenton-May V., Le Brun P. (eds). *Practical Pharmaceutics*. New York: Springer; 2015. P. 769–796. DOI: 10.1007/978-3-319-15814-3_35.
9. Oluwadare O. P., Ola-Olorun O. J., Oluwale B. A. Assessment of Total Quality Management Adoption Level in Pharmaceutical Manufacturing Companies in Southwestern Nigeria. *JERA* 2019;43:168–177. DOI: 10.4028/www.scientific.net/jera.43.168.
10. Jyoti S., Sarthak S. Human Resource Management in Japan. *Advances in Management*. 2019;12(1):48–53.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-142-147
УДК 615.1(075)

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Документирование фармацевтической разработки. Часть 1. Изучение документооборота предприятия

И. Е. Смехова[1], Л. В. Шигарова[1]*, В. Д. Метелева[1], Е. В. Флисюк[1]

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

***Контактное лицо:** Шигарова Лариса Владимировна. **E-mail:** larisa.shigarova@pharminnotech.com

ORCID: И. Е. Смехова – https://orcid.org/0000-0002-0013-4784; Л. В. Шигарова – https://orcid.org/0000-0002-9578-6418; В. Д. Метелева – https://orcid.org/0000-0001-7641-2114; Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462.

Статья поступила: 30.11.2020. **Статья принята в печать:** 11.01.2021. **Статья опубликована:** 25.02.2021

Резюме

Введение. Тенденции современной фармацевтической отрасли демонстрируют необходимость надлежащего документирования всех стадий жизненного цикла лекарственного препарата для обеспечения его качества и исключения рисков для пациентов. Поэтому документирование фармацевтической разработки, как первого этапа этого цикла, является актуальным. Оно позволит регламентировать технологические процессы, показатели качества продукции, а также обеспечить целостность получаемых данных. Документирование фармацевтической разработки целесообразно вести с учетом требований, установленных на предприятии, где планируется промышленное производство данного лекарственного препарата.

Цель. Разработка документации по фармацевтической разработке в рамках фармацевтической системы качества предприятия. Одной из задач исследования был анализ документооборота фармацевтической системы качества предприятия, планирующего выпуск суппозиториев, для надлежащей разработки документации по фармацевтической разработке лекарственного препарата в этой лекарственной форме.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы следующие методы: контент-анализ; системный анализ; социологический (метод опроса); технология SWOT-анализа; системный подход.

Результаты и обсуждение. Для знакомства с современными тенденциями, связанными с фармацевтической разработкой и фармацевтической системой качества, на первом этапе был проведен анализ руководящего документа ICH (International Council on Harmonization) Рабочей группы по применению Руководств Q8, Q9, Q10 «Вопросы и ответы». Важным подготовительным этапом для оптимального документирования фармацевтической разработки явилось изучение документооборота фармацевтической системы качества предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев. С этой целью в процессе исследования был разработан опросный лист, содержащий вопросы, касающиеся функционирования системы качества, процессов документирования и ведения производства. Проведенный анализ полученных ответов позволил получить информацию по документированию фармацевтической разработки лекарственных препаратов, а также определить в рамках фармацевтической системы качества основные тенденции, связанные с данным процессом.

Заключение. Проведен анализ документооборота фармацевтической системы качества предприятия, планирующего выпуск суппозиториев. Установлены сильные и слабые стороны документооборота, выделен ряд предложений для улучшения системы документации. На основании полученных результатов будут разработаны предложения по оптимальному документированию фармацевтической разработки и сформирован комплект документов для предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, фармацевтическая система качества, документирование, суппозитории, надлежащая производственная практика.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. Д. Метелева выполняла практические опыты, обрабатывала результаты. И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова, Е. В. Флисюк обрабатывали результаты. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Метелева В. Д., Флисюк Е. В. Документирование фармацевтической разработки. Часть 1. Изучение документооборота предприятия. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(1):142–147. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-142-147

Documentation of Pharmaceutical Development. Part 1. Study of the Documentation of the Site

Irina E. Smekhova[1], Larisa V. Shigarova[1]*, Valeria D. Meteleva[1], Elena V. Flisyuk[1]

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

***Corresponding author:** Larisa V. Shigarova. **E-mail:** larisa.shigarova@pharminnotech.com

ORCID: Irina E. Smekhova – https://orcid.org/0000-0002-0013-4784; Larisa V. Shigarova – https://orcid.org/0000-0002-9578-6418; Valeria D. Meteleva – https://orcid.org/0000-0001-7641-2114; Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462.

Received: 30.11.2020. **Revised:** 11.01.2021. **Published:** 25.02.2021

Abstract

Introduction. The trends in the modern pharmaceutical industry demonstrate the need for proper documentation of all stages of the life cycle of a medicinal product to ensure its quality and eliminate risks to patients. Therefore, documenting pharmaceutical development, as the first stage of this cycle, is relevant. It will allow regulating technological processes, product quality indicators, as well as ensuring the integrity of the data

© Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Метелева В. Д., Флисюк Е. В., 2021
© Smekhova I. E., Shigarova L. V., Meteleva V. D., Flisyuk E. V., 2021

received. It is advisable to document the pharmaceutical development taking into account the requirements established at the enterprise where the industrial production of this drug is planned.
Aim. Development of documentation for pharmaceutical development within the pharmaceutical quality system of the enterprise. One of the objectives of the study was to analyze the document flow of the pharmaceutical quality system of the enterprise planning the production of suppositories for the proper development of documentation for the pharmaceutical development of a medicinal product in this dosage form.
Materials and methods. During the research the following methods were used: content analysis; system analysis; sociological (survey method); SWOT analysis technology; systems approach.
Results and discussion. In order to get acquainted with modern trends related to pharmaceutical development and pharmaceutical quality system, at the first stage, an analysis of the ICH (International Council on Harmonization) guidance document Quality Implementation Working Group on Q8, Q9 and Q10 Questions & Answers was carried out. An important preparatory stage for the optimal documentation of a pharmaceutical development was the study of the document flow of the pharmaceutical quality system of an enterprise planning to produce two-component suppositories. For this purpose, in the course of the research, a questionnaire was developed containing questions related to the functioning of the quality system, documentation processes and production. The analysis of the received responses made it possible to obtain information on documenting the pharmaceutical development of medicinal products, as well as to identify the main trends associated with this process within the pharmaceutical quality system.
Conclusion. The documentation of the pharmaceutical quality system of the enterprise planning the production of suppositories has been analyzed. The strengths and weaknesses of the documentation are identified, a number of proposals for improving the documentation system are highlighted. Based on the results obtained, proposals will be developed for the optimal documentation of pharmaceutical development and a set of documents for an enterprise planning to produce two-component suppositories will be formed.

Keywords: pharmaceutical development, pharmaceutical quality system, documentation, suppositories, good manufacturing practices.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Valeria D. Meteleva performed practical experiments and processed the results. Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova, Elena V. Flisyuk processed the results. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

For citation: Smekhova I. E., Shigarova L. V., Meteleva V. D., Flisyuk E. V. Documentation of pharmaceutical development. Part 1. Study of the documentation of the site. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(1):142–147. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-142-147

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фармацевтическая промышленность является одной из ведущих отраслей в мире. Её развитие продиктовано потребностью в насыщении рынков разных стран необходимыми, безопасными, эффективными и качественными лекарственными препаратами (ЛП).

Многие фармацевтические предприятия осуществляют деятельность не только по производству продукции для профилактики, лечения различных заболеваний, но и проводят прикладные исследования и разработки по созданию инновационных ЛП, обладающих высокой терапевтической активностью и соответствующих современным требованиям.

Фармацевтическая разработка нового уникального препарата – это трудоемкий и длительный процесс, требующий многоплановых и дорогостоящих исследований. Она включает в себя комплекс экспериментальных исследований, направленных на обоснование состава ЛП и лекарственной формы, производственного процесса, выбора упаковочных материалов и др., а также на изучение свойств продукта [1].

Тенденции современной фармацевтической отрасли демонстрируют необходимость надлежащего документирования всех стадий жизненного цикла ЛП для обеспечения его качества и исключения рисков для пациентов. Поэтому надлежащее документирование фармацевтической разработки, как первого этапа этого цикла, является актуальным. Оно позволит регламентировать технологические процессы, показатели качества продукции, а также обеспечить целостность получаемых данных.

Целью исследования явилась разработка документации по фармацевтической разработке в рамках фармацевтической системы качества предприятия.

На первом этапе исследования была поставлена задача: провести анализ документооборота фармацевтической системы качества предприятия, планирующего выпуск суппозиториев, для создания надлежащей документации по фармацевтической разработке лекарственного препарата в этой лекарственной форме.

ЛП проходит долгий путь от идеи создания до промышленного производства, обращения продукта на рынке и далее, до прекращения его выпуска и завершения медицинского применения. Выделяют следующие стадии жизненного цикла ЛП [2]:

- фармацевтическая разработка;
- перенос (трансфер) технологии;
- промышленное производство;
- прекращение выпуска продукта.

На начальном этапе – этапе фармацевтической разработки – закладывается качество ЛП, которое затем обеспечивается и непрерывно совершенствуется на протяжении всего жизненного цикла продукта [3].

Поэтому к разработке, как одному из наиболее ответственных этапов, предъявляется ряд требований, отраженных в существующей нормативной документации и регуляторной практике.

Международный совет по гармонизации технических требований ICH (International Council on Harmonization) предложил современный подход к фармацевтической разработке ЛП и концепции фармацевтической системы качества (ФСК), который поддерживается такими руководствами, как:

- ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [2];
- ICH Q9 «Управление рисками по качеству» [4];
- ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» [5].

Парадигма Руководств ICH Q8, Q9 и Q10 предполагает значительный рост уровня экспериментальных исследований и авторитетности науки при создании ЛП. Следует учесть, что эффект от гармонизации технических требований может быть достигнут только в том случае, если указания всей триады Руководств будут внедряться последовательно на всех этапах жизненного цикла ЛП.

В свете современной регуляторной политики деятельность по фармацевтической разработке должна основываться на таких процессах ФСК, как управление рисками по качеству и управление знаниями.

Внедрение управления знаниями в процесс фармацевтической разработки продукта, а затем распространение на все последующие стадии его жизненного цикла позволит успешно реализовать концепцию триады Руководств ICH Q8, Q9, Q10.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели для документирования нами было выбрано предприятие, планирующее выпуск двухкомпонентных ректальных суппозиториев. Фармацевтическая разработка ЛП проводилась сторонней организацией.

В ходе исследования были использованы следующие методы:

- контент-анализ;
- системный анализ;
- социологический (метод опроса);
- технология SWOT-анализа;
- системный подход.

Метод контент-анализа использовался для сбора данных, содержащихся в научной литературе и в различных нормативных документах.

Системный анализ служил основой для логического и последовательного подхода к решению поставленных задач исследования.

Социологический метод – метод опроса – позволил разработать опросный лист для предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

Технология SWOT-анализа является методом стратегического планирования. С его помощью были обработаны данные опросного листа. Анализ позволил систематизировать информацию при выявлении внутренних и внешних факторов предприятия, а также спрогнозировать оптимальные решения для улучшения документооборота.

Системный подход применялся при создании документации на суппозитории в рамках ФСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для знакомства с современными тенденциями, связанными с фармацевтической разработкой и ФСК, на первом этапе был проведен анализ руководящего документа ICH Рабочей группы по применению Руководств Q8, Q9, Q10 «Вопросы и ответы» [6]. Были получены также сведения о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев с оригинальными субстанциями, что позволило сформировать представление о процессе создания продукта.

Структура документа «Questions & Answers» («Вопросы и ответы») представлена в формате «вопрос-ответ» (таблица 1). Вопросы задавали представители фармацевтической отрасли, отвечали представители регуляторных органов стран совета ICH (Европейский союз, США, Япония).

Таблица 1. Структура документа Рабочей группы ICH по реализации Руководств Q8, Q9, Q10 «Вопросы и ответы»

Table 1. Structure of the Quality Implementation Working Group on Q8, Q9 and Q10 Questions & Answers

Раздел Section	**Название раздела** Section title	**Количество рассмотренных вопросов** Number of issues considered
1	Общие положения (регуляторные требования, валидация, анализ рисков) General (regulatory requirements, validation, risk analysis)	3
2	Качество при разработке Quality by design	1
2.1	Пространство проектных решений Design Space	9
2.2	Испытания в режиме реального времени и выпуск продукции Real Time Release Testing	11
2.3	Стратегия контроля Control Strategy	5
3	Фармацевтическая система качества Pharmaceutical quality system	8
4	Влияние Руководств по качеству ICH на практику GMP инспекций ICH new quality guidelines' impact on GMP inspection practices	3
5	Управление знаниями Knowledge management	5
6	Использование программного обеспечения Software solutions	1

Анализ данного документа позволил выделить ключевые моменты, определяющие основные принципы нового подхода к разработке «качество при разработке» (QbD), отражающие преимущества внедрения Руководства Q10 в деятельность предприятий,

значимости источников знаний и управления знаниями, а также в необходимости последовательного внедрения методических указаний Руководств ICH Q8, Q9, Q10 в процесс фармацевтической разработки.

На следующем этапе был проведен анализ документооборота предприятия и его системы обеспечения качества.

Важным подготовительным этапом для дальнейшего документирования фармацевтической разработки явилось изучение документооборота ФСК предприятия. Предприятие, планирующее выпуск двухкомпонентных суппозиториев (как и любое другое фармацевтическое предприятие), должно иметь всесторонне разработанную и эффективно функционирующую ФСК. Поэтому перед составлением документов по фармацевтической разработке целесообразно предварительно ознакомиться с документами ФСК и провести их анализ. Для этой цели нами был разработан опросный лист, в который включены вопросы о функционировании ФСК на предприятии, процессах документирования и ведения производства. Структура опросного листа представлена в таблице 2.

Таблица 2. Структура опросного листа

Table 2. Structure of the Questionnaire

№ п/п №	Разделы опросного листа Sections of the questionnaire	Количество заданных вопросов Number of questions asked
1	Фармацевтическая система качества Pharmaceutical quality system	25
2	Персонал Staff	5
3	Помещения и оборудование Production areas and equipment	8
4	Документация Documentation	7
5	Производство и контроль качества Production and quality control	7

Опросный лист составлен таким образом, чтобы сформировать представление о системе обеспечения качества предприятия и реализации им требований Правил надлежащей производственной практики (GMP).

Опросный лист был передан для заполнения предприятию, планирующему выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

Полученные данные опросного листа были обработаны с помощью технологии SWOT-анализа [7], который является современным подходом к анализу сильных (Strengths) и слабых (Weaknesses) сторон компании, оценке её возможностей (Opportunities) и рисков (Threats).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённый анализ позволил систематизировать информацию по выявлению внутренних и внешних факторов предприятия. К внутренним факторам относятся сильные и слабые стороны предприятия, т. е. то, на что влияет сам объект анализа. К внешним факторам – возможности и риски, т. е. то, что влияет на объект извне и не может контролироваться самим объектом [8].

Было установлено, что к сильным сторонам документооборота предприятия относятся:

- единая система документации;
- наличие электронного документооборота;
- структурированность документов;
- контроль за соблюдением требований к внутренней документации;
- соответствие структуры документооборота требованиям правил GMP.

В то же время были выявлены слабые стороны предприятия, такие как неэффективное проведение анализа со стороны руководства в рамках системы качества и отсутствие документации по управлению знаниями о процессе и продукте. Таким образом, установлено, что слабые стороны требуют:

- актуализации системы анализа со стороны руководства в рамках ФСК;
- включения в документооборот регламентирующих и регистрирующих документов по управлению знаниями о процессе и продукте.

Анализ также позволил установить, что у предприятия существует ряд возможностей для улучшения системы документооборота, к которым можно отнести:

- повышение качества процесса;
- улучшенный (непрерывный) контроль за документооборотом предприятия;
- полноту информации, содержащейся в документах;
- сокращение сроков реализации процессов.

В то же время был выявлен ряд рисков, связанных с зависимостью документооборота предприятия от:

- актуальных стандартов, руководств и т. д.;
- исполнителей процесса.

По результатам SWOT-анализа были разработаны предложения по оптимизации системы документации предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

Так как информация, содержащаяся в документах, является основой для принятия решений, то существует необходимость в улучшении процесса управления документацией на предприятии. Оптимизация позволит дополнить документооборот необходимыми документами по управлению знаниями, снизить вероятность появления потенциально возможных рисков в ходе производственного процесса, чтобы в целом повысить качество работы.

Анализ ответов, полученных в опросном листе, показал, что на предприятии действует гибридный (электронный и бумажный) документооборот. Наличие электронного документооборота является преимуществом, которое позволяет:

- контролировать доступ к документации системы качества;
- ускорить процесс обработки данных;

- исключить риски обращения и использования неактуальных документов;
- вести контроль за всеми этапами разработки документации;
- сократить сроки подготовки документов при введении в систему документооборота предприятия.

При анализе данных опросного листа было установлено также, что на предприятии представлены основные виды документации, которые разработаны в соответствии с требованиями правил GMP. Соотношение регламентирующих и регистрирующих документов показано на рисунке 1.

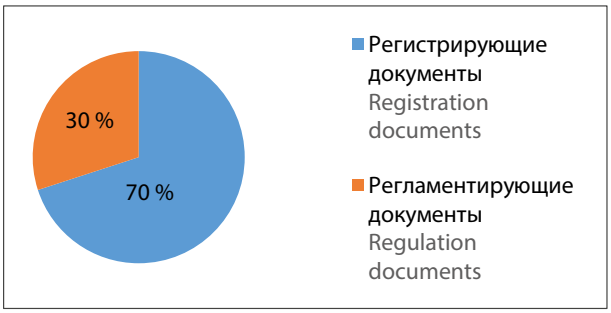


Рисунок 1. Соотношение регламентирующих и регистрирующих документов предприятия

Figure 1. Ratio of the regulation and registration documents of the enterprise

Регистрирующих документов значительно больше, чем регламентирующих. Это связано, по-видимому, с тем, что для каждого процесса требуется определённый набор записей, обеспечивающий целостность данных о качестве процесса и продукта.

Установлено, что вся документация предприятия структурирована и систематизирована. Структура документации предприятия с указанием действующих процессов и уровней документации, представлена в таблице 3.

Анализ показал, что на предприятии, планирующем выпуск двухкомпонентных суппозиториев, имеются основные руководящие документы (стандарты), соответствующие требованиям правил GMP, как ключевая неотъемлемая часть ФСК. Кроме того, представлены основные формы производственных записей (маршрутные карты, протоколы, листы извещений и т. д.), что говорит о том, что предприятие уделяет надлежащее внимание регистрации всех протекающих процессов.

Прослеживается иерархическая структура документации на предприятии, где каждому уровню соответствуют определенные виды документации:

- 1-му уровню – руководящие документы (Руководство по качеству, стандарты);
- 2-му уровню – документы, регламентирующие процессы (инструкции, СОП, спецификации);
- 3-му уровню – документы, протоколирующие процедуры и первичные записи (записи, отчеты, листы регистрации, журналы, маршрутные карты).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведен анализ документооборота фармацевтической системы качества предприятия, планирующего выпуск суппозиториев. Установлены сильные и слабые стороны документооборота предприятия, выделен ряд предложений для улучшения системы документации, что позволит осуществлять выпуск продукции надлежащего качества.

На основании полученных результатов будут разработаны предложения по оптимальному документированию фармацевтической разработки и сформирован комплект документов для предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильдеева Г. Н., Белостоцкий А. В. Концепция Quality-by-Design как ключевой элемент в обеспечении качества лекарственных препаратов. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике*. 2017;3:54–57.
2. ICHQ8 Pharmaceutical development. Avaliable at: http://www.ich.org.
3. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;3(20):170–176.
4. ICHQ9 Risk Quality Management. Avaliable at: http://www.ich.org.
5. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Avaliable at: http://www.ich.org.
6. Quality Implementation Working Group on Q8, Q9 and Q10 Questions & Answers (R4). Avaliable at: http://www. ich.org.
7. Герман Н. В. Применение SWOT-анализа для документирования внутренних документов на предприятиях. *Международный студенческий научный вестник. Электронный журнал*. Avaliable at: https://scienceforum.ru/2015/article/2015007892.
8. Гайдук В. И., Такахо Э. Е. Методы и инструменты стратегического планирования. *Политематический сетевой научный журнал КубГАУ*. 2014;103:764–781.

REFERENCES

1. Gildeeva G. N., Belostockiy A.V . Quality-by-Design concept as the key element in ensuring the quality of medicines. *Remedium. Zhurnal o rossiyskom rynke lekarstv i meditsinskoy tekhnike.* 2017;3:54–57. (In Russ.).
2. ICHQ8 Pharmaceutical development. Avaliable at: http://www.ich.org.
3. Rozhnova S. A., Tsypkina A. V. Analysis of the system organization of pharmaceutical drug development. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2017;3(20):170–176. (In Russ.).
4. ICHQ9 Risk Quality Management. Avaliable at: http://www.ich.org.
5. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Avaliable at: http://www.ich.org.
6. Quality Implementation Working Group on Q8, Q9 and Q10 Questions & Answers (R4). Avaliable at: http://www. ich.org.
7. German N. V. Application of SWOT analysis for documenting internal documents in sites. *Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik. Electronic journal.* Avaliable at: https://scienceforum.ru/2015/article/2015007892. (In Russ.).
8. Gayduk V. I., Takakho E. E. Methods and tools of strategy planning. *Politematicheskiy setevoy nauchnyy zhurnal KubGAU = Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2014;103:764–781. (In Russ.).

Таблица 3. Структура документации предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев

Table 3. Structure of documentation of the enterprise that plans to produce two-component suppositories

Уровень документов Document level / **Процесс управления** Management process	**Документы** Documents		
	Высшего уровня Top level	**Регламентирующие процесс** Regulating the process	**Для протоколирования процедур** For logging procedures
Надлежащая документация Good documentation	Стандарт «Руководство по качеству» Quality Manual Standard	Стандарт предприятия (СТП) «Управление документами и записями»; СОП «Порядок разработки, оформления, внесения изменений и утверждения документов» Enterprise Standard (STP) "Document and Records Management"; SOP "Procedure for the development, execution, modification and approval of documents"	Формы записей: маршрутные карты, протоколы, акты, журналы, извещения, листы Forms of records: route maps, protocols, acts, magazines, notices, sheets
Производственные помещения и оборудование Production facilities and equipment		Стандартная операционная процедура (СОП) Standard Operating Procedure (SOP)	Маршрутные карты, журналы, акты о проведении работ Route maps, magazines, acts of work
Персонал Staff		СТП «Система обучения персонала» STP "Personnel training system"	Должностные инструкции, акты обучения, листы ознакомления Job descriptions, training certificates, familiarization sheets
Работа по самоинспекциям Self-inspection		СТП «Организация и порядок проведения внутреннего аудита (самоинспекций)» STP "Organization and procedure for conducting internal audit (self-inspections)"	Протокол самоинспекций подразделения, отчет по самоинспекциям Unit self-inspection protocol, self-inspection report
Риски Risks		СТП «Управление рисками по качеству» STP "Quality Risk Management"	В соответствии с выбранными инструментами оценивания рисков на предприятии According to the selected risk assessment tools
Знания о продукте и процессе Product and Process Knowledge		Отсутствует Is absent	Отсутствует Is absent
Система мониторинга процессов и качества продукта Monitoring system of processes and product quality		СТП «Порядок формирования ежегодного обзора качества продукта» STP "Procedure for the formation of the annual review of product quality"	Маршрутные карты, протоколы, журналы мониторинга, протоколы контроля качества Route charts, protocols, monitoring logs, quality control protocols
Система корректирующих и предупреждающих действий (CAPA) Corrective actions and preventive actions (CAPA)		СТП «Корректирующие и предупреждающие действия» STP "Corrective and Preventive Actions"	Протоколы Protocols
Система управления изменениями Change management system		СТП «Контроль и управление изменениями» STP "Control and management of changes"	Протоколы изменений, протоколы анализов рисков Change protocols, risk analysis protocols
Система анализа со стороны руководства Management review		Требуется актуализация Update required	Отчеты, сводные отчеты Reports, summary reports

АНАЛИТИКА ЭКСПО

a Hyve event

19-я Международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

13–16.04.2021

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»

analitikaexpo.com

Забронируйте стенд

0+

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-149-150

Check for updates

CC BY 4.0

Исправление к статье: «Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L.»

С. В. Горяинов, С. Эспарса, В. А. Ивлев, Д. И. Писарев, Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, О. О. Новиков, О. Г. Потанина, С. Лазар, А. В. Хромов, Н. Н. Бойко

Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020;9(3):137–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141. Статья опубликована: 28.08.2020.

На странице 137 в исходную версию статьи не были включены следующие авторы: С. В. Горяинов, С. Эспарса, В. А. Ивлев. Список авторов был изменены с учетом их упущения.

Были дабавлены ORCID этих авторов:
С. В. Горяинов – https://orcid.org/0000-0002-7625-9110; С. Эспарса – https://orcid.org/0000-0002-8200-6208;
В. А. Ивлев – https://orcid.org/0000-0001-9664-9506

Авторы были добавлены в раздел «Вклад авторов».
Вместо: Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, Н. Н. Бойко, С. Лазар разработали схему выделения липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L. Д. И. Писарев, О. О. Новиков, А. В. Хромов и О. Г. Потанина провели аналитическое исследование выделенных фракций семян *N. sativa* L., обработку данных и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.
Исправлено на: Г. Бакореза, Р. А. Абрамович, Н. Н. Бойко, С. Лазар разработали схему выделения липофильных и гидрофильных компонентов семян *N. sativa* L. С. В. Горяинов, В. А. Ивлев, С. Эспарса, Д. И. Писарев, О. О. Новиков, А. В. Хромов и О. Г. Потанина провели аналитическое исследование выделенных фракций семян *N. sativa* L., обработку данных и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Авторы были добавлены в раздел «Для цитирования».
Вместо: Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):137–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141
Исправлено на: Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):137–141. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141

Авторы были добавлены после знака охраны авторского права – ©:
Вместо: © Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н., 2020
Исправлено на: © Горяинов С. В., Ивлев В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н., 2020

Внесение исправление не повлияло на содержание статьи.

Обновлена онлайн-версия статьи на сайте журнала.

Erratum: "A Technology for Isolation and Analysis of Lipophilic and Hydrophilic Biologically Active Components from *N. sativa* L. Seeds"

Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Oleg O. Novikov, Olga G. Potanina, Simon Lazar, Arkidiy V. Khromov, Nikolay N. Boyko

Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration. 2020;9(3):137–141. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141. Published: 28.08.2020.

On page 137, the following authors were not included in the original version of the article: Sergey V. Goryainov, Cesar Esparsa, Vasily A. Ivlev. The list of authors has been modified for omission.

On page 138 the ORCIDs of these authors have been added:
Sergey V. Goryainov – https://orcid.org/0000-0002-7625-9110; Cesar Esparza – https://orcid.org/0000-0002-8200-6208; Vasily A. Ivlev – https://orcid.org/0000-0001-9664-9506

Authors have been added to the "Contribution of the authors" section.
Instead: Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Nikolay N. Boyko, developed a scheme for the isolation of lipophilic and hydrophilic components of seeds of *N. sativa* L. Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Arkidiy V. Khromov, and Olga G. Potanina conducted an analytical study of the isolated fractions of *N. sativa* L. seeds, data processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.
Corrected to: Gohara Bacorese, Rimma A. Abramovich, Nikolay N. Boyko, developed a scheme for the isolation of lipophilic and hydrophilic components of seeds of *N. sativa* L. Sergey V. Goryainov, Cesar Esparza, Vasily A. Ivlev, Dmitry I. Pisarev, Oleg O. Novikov, Arkidiy V. Khromov, and Olga G. Potanina conducted an analytical study of the isolated fractions of *N. sativa* L. seeds, data processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and wrote the manuscript.

Authors have been added to the "For Citation" section.
Instead: Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):137–141. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141
Corrected to: Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):137–141. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141

The authors were added after the copyright mark – ©:
Вместо: © Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N., 2020
Исправлено на: © Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N., 2020

The correction did not affect the content of the article.

The online version of the article on the journal's website has been updated.

ПАМЯТИ ЮРИЯ НИКОЛАЕВИЧА ЧЕРНОВА

5 ноября 1937 г. – 1 января 2021 г.

1 января 2021 г. ушел из жизни профессор **Юрий Николаевич Чернов**, доктор медицинских наук, заслуженный врач РФ, академик Международной академии человека в аэрокосмических системах, член-корреспондент РАЕН, почетный доктор Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны, специалист в области клинической фармакологии и авиакосмической радиобиологии, почетный профессор Воронежского государственного медицинского университета имени Н. Н. Бурденко.

Юрий Николаевич Чернов родился 5 ноября 1937 г. в городе Воронеже. Стремление к научно-исследовательской работе проявилось уже в школьные годы. За работы по биологии награжден почётной грамотой ЦК ВЛКСМ (1954), бронзовой медалью участника ВДНХ (1954).

После окончания Воронежского медицинского института в 1961 году по специальности «лечебное дело» работал врачом-терапевтом. В январе 1964 года поступил в аспирантуру при кафедре фармакологии Воронежского медицинского института. В 1971 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме «Влияние пчелиного яда (апизартрона) и его сочетания с маточным молочком (апилаком) на течение и исход экспериментального миокардита». Работа была издана на пяти языках, получила признание на XXIII Международном конгрессе по пчеловодству Апимондия, Москва (1971).

С 1971 г. по 1987 г. **Юрий Николаевич Чернов**, работая ассистентом, старшим преподавателем, доцентом кафедры фармакологии, сочетает научно-исследовательскую, педагогическую работу с организационной и общественной деятельностью. В 1973 году был назначен заместителем декана. С 1992 по 2006 гг. трижды был избран деканом лечебного факультета Воронежской государственной медицинской академии.

33 года работал **Юрий Николаевич Чернов** в деканате самого большого лечебного факультета ВГМУ им. Н. Н. Бурденко.

Будучи выдающимся организатором и разносторонне эрудированным человеком, **Юрий Николаевич** умел стратегически мыслить и успешно решать поставленные задачи, опираясь на знание человеческой психологии, жизненный опыт и умение конструктивно вести беседу.

Справедливость и беспристрастность, честность и открытость, проницательность, самоконтроль – именно за эти качества **Юрий Николаевич** пользовался уважением и авторитетом среди профессорско-преподавательского состава, аспирантов, ординаторов и студентов, среди которых ходила крылатая фраза: «Чернов лечфаку больше чем декан, не всем дано деканами родиться…».

В 1980 году приказом Министра обороны **Юрий Николаевич Чернов** был прикомандирован к Государственному НИИИ авиационной и космической медицины (с 1999 «ГНИИИ ВМ» МО), где под руководством академика МАА В. В. Антипова занимался проблемами противорадиационной защиты экипажей летательных аппаратов.

В 1987 г. **Юрий Николаевич Чернов** возглавил впервые созданную при его активном участии в Воронежской медицинской академии кафедру клинической фармакологии, которой заведовал до 2011 г., а затем оставался почетным профессором кафедры клинической фармакологии ВГМУ имени Н. Н. Бурденко. Являясь примером высокого профессионализма и большого трудолюбия, с неутомимой энергией приверженный своему делу, **Юрий Николаевич** умел поддержать, ободрить коллег, вселить веру в успех и мотивировать сотрудников на движение вперёд, к достижению поставленной цели.

В период с 1980 г. по 1991 г. на базе Государственного научно-исследовательского испытательного института (авиационной и космической медицины) проводил диссертационное исследование, в 1991 г. защитил докторскую диссертацию. Темой его исследований было изучение биохимических сдвигов в головном мозге на фоне функциональных и поведенческих проявлений лучевого поражения ЦНС и разработка средств фармакологической коррекции данных нарушений.

Талантливый ученый фармаколог, токсиколог, профессор **Ю. Н. Чернов** всегда стремился к разработке новых направлений научных исследований, необходимых для решения задач в клинической практике.

Под руководством **Юрия Николаевича Чернова** проводились научные исследования по мониторированию побочного действия лекарственных препаратов, фармакогенетике и экологической фармакологии, клинической фармакологии препаратов для лечения сахарного диабета, артериальной гипертензии, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, лекарственному взаимодействию, противомикробной терапии, фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции.

Важное значение профессор **Ю. Н. Чернов** придавал вопросам фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии, включая разработку программного обеспечения для расчета стоимости фармакотерапии в реальной клинической практике.

Научные исследования включали в себя не только клинические работы, но и труды по экспериментальной фармакологии, в том числе способ оптимизации терапии при отравлении антипсихотическими препаратами, поиск адаптогенной активности природных соединений, изучение при помощи фармакологического анализа структурных и гистохимических изменений в коре головного мозга при церебральном синдроме острой лучевой болезни, фармакологическая коррекция облучения сверхсмертельными дозами ионизирующей радиации с последующей разработкой новых радиопротекторов.

Основные научные исследования на базе Института авиационной и космической медицины проводились в области радиобиологии, также была разработана комплексная оценка здоровья лиц операторских профессий для обеспечения высокого уровня боеспособности и продления «профессионального долголетия» личного состава ВВС, принципы эффективного и безопасного назначения лекарственных средств у лиц операторских профессий.

Профессор **Ю. Н. Чернов** является автором 520 научных публикаций, 5 учебников по клинической фармакологии, 27 учебных пособий, 6 монографий, 2 глав национального руководства по клинической фармакологии (2009), практического руководства по авиационной и клинической медицине (2011), 42 патентов и 5 программных обеспечений, зарегистрированных в Реестре программ РФ.

Профессором **Ю. Н. Черновым** создана научная школа ученых – клинических фармакологов, под его руководством подготовлено и защищено 32 кандидатских диссертации, 4 докторские диссертации, его ученики успешно работают в России, странах СНГ, Европы, США и Великобритании.

Замечательный педагог, блестящий оратор **Юрий Николаевич Чернов** много сил отдавал вопросам преподавания клинической фармакологии, его яркие лекции всегда вызывали интерес аудитории студентов, аспирантов, клинических ординаторов, врачей последипломного обучения. Профессор **Ю. Н. Чернов** участвовал в разработке учебных программ по дисциплине для медицинских вузов страны, в создании методических пособий, направленных на формирование системного подхода к освоению необходимых профессиональных знаний у студентов выпускных курсов для эффективного и безопасного применения лекарственных препаратов. Наличие незаурядных деловых и личностных качеств помогало ему в решении многочисленных задач.

Профессор **Ю. Н. Чернов** впервые в Центрально-Черноземном регионе организовал курс постдипломной подготовки врачей – клинических фармакологов. Результатом его усилий стала организация службы клинической фармакологии Воронежской и Липецкой областей, подготовка врачей – клинических фармакологов для медицинских организаций Тамбова и Белгорода.

В течение 5 лет профессор **Ю. Н. Чернов** был в составе фармакологического комитета СССР (1-я комиссия); состоял членом правления Ассоциации клинических фармакологов стран СНГ, членом проблемной комиссии № 32.02 РАМН «Фармакология сердца и сосудов»; членом бюро проблемной комиссии № 32.06 «Клиническая фармакология» – Первый МГМУ им. Сеченова, членом диссертационного совета ВГМУ им. Н. Н. Бурденко.

Член редколлегии журналов «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Москва), «Лекарственные средства» (Москва), федерального ежегодного руководства «Формулярная система».

Профессор **Ю. Н. Чернов** внес научный вклад в развитие и укрепление международных связей фармакологов нашей страны с европейским научным сообществом.

С 1997 г. до 2018 г. активно поддерживал научные контакты с институтом клинической фармакологии клиники Шарите (Германия), где проводились совместные исследования по изучению роли полиморфных ферментов в развитии различных видов рака и где под его руководством была выполнена научная работа «Генотипирование ферментов лекарственного метаболизма».

Профессор **Ю. Н. Чернов** – клинический фармаколог высшей врачебной квалификации, заслуженный врач России, имел звание «Отличник здравоохранения». За достижения в космической медицине и многочисленные открытия награжден почетной грамотой Главкома ВВС, орденом «Дружбы народов», медалью «Ветеран ВВС», медалью им. Ю. А. Гагарина, медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, медалью Г. К. Жукова, медалью «Ветеран труда», знаком отличия «За заслуги перед Воронежской областью», был лауреатом форума «Золотой фонд Воронежской области» в номинации «образование».

Юрий Николаевич Чернов был большим ученым, замечательным педагогом, яркой личностью, глубоким и мужественным человеком. Высокий профессионализм, мудрость и добросердечное отношение профессора **Ю. Н. Чернова** всегда будут в памяти научной общественности, а также его многочисленных учеников, коллег и всех, кто знал и работал с **Юрием Николаевичем**.

СВЕТЛАЯ ПАМЯТЬ!

М. В. Васин, д. м. н., профессор кафедры медицины катастроф РМАНПО; ст. н. с., Научно-исследовательский испытательный центр (авиационно-космической медицины и военной эргономики) Центрального НИИ ВВС МО РФ.

И. Э. Есауленко, ректор ВГМУ им. Н. Н. Бурденко, д. м. н., профессор, академик РАЕН, заслуженный работник высшей школы РФ.

В. Г. Кукес, д. м. н., академик РАН, профессор. Первый МГМУ им. И. М. Сеченова.

И. Б. Ушаков, академик РАН, ГНЦ РФ-ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России.

Первая в Сибири международная выставка оборудования, сырья и услуг для производства фармацевтических препаратов и форум для специалистов фармацевтической отрасли.

ТЕХНОФАРМ
СИБИРЬ

31 марта и 1 апреля 2021 г.

NOVOSIBIRSK EXPO CENTRE

Организатор: ООО ТехноФарм www.techno-farm.com

@tehnopharm_sib
expo@techno-farm.com
+ 7-913-891-39-39
(по вопросам участия)
+ 7-913-003-77-75
(по вопросам рекламных и спонсорских возможностей)
+ 7-961-216-99-51
(регистрация посетителей)

Для бесплатного посещения выставки, пожалуйста, заполните форму на сайте.

Ждём Вас на выставке!

www.technopharm-siberia.com

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 этичного поведения всех вовлеченных в публикацию сторон (авторов, редакторов журнала, рецензентов, издательства и научного общества). Журнал с помощью всестороннего, объективного и честного рецензирования стремится отбирать для публикации лишь материалы, касающиеся научных исследований наивысшего качества.

Научно-практический журнал общемедицинского профиля **«Разработка и регистрация лекарственных средств»** является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты передовых исследований фармацевтической отрасли.

Журнал публикует оригинальные и обзорные научные статьи по темам:

- поиск и разработка новых лекарственных средств;
- фармацевтическая технология;
- методы анализа лекарственных средств;
- доклинические и клинические исследования;
- регуляторные вопросы.

Наименование и содержание научных работ, публикуемых в журнале **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**, должно соответствовать науке:

- 14.04.01 – Технология получения лекарств (фармацевтические науки);
- 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки);
- 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикуемые материалы должны соответствовать следующим критериям:

- Научная актуальность и значимость проблемы, которой посвящена статья (тематика статьи должна представлять интерес для широкого круга исследователей, занимающихся разработкой и регистрацией лекарственных средств).
- Высокая степень доказательности (современная исследовательская база, наличие сертификатов на оборудование, достаточный объем выборок и подходы к математической обработке результатов исследования).
- Концептуальный характер исследования (авторы не должны ограничиваться констатацией фактов, необходим анализ полученного материала с учетом данных литературы, должны быть высказаны новые идеи и гипотезы).

УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ В ЖУРНАЛЕ

1. К рассмотрению принимаются материалы только в электронном виде, направленные в редакцию через систему на сайте в формате .doc или .docx (незащищенный формат файлов).
2. Рассматриваются только оригинальные материалы, ранее не публиковавшиеся и не нарушающие авторские права других лиц. Все статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат»; уникальность текста статьи должна составлять не менее 75 %. При выявлении подобных текстов одного и того же автора в других печатных и электронных изданиях, статья снимается с публикации.
3. Согласно требованиям Высшей аттестационной комиссии, журнал отдает приоритет аспирантским и докторским работам, срок их публикации зависит от предполагаемой даты защиты, которую авторы должны указать в первичных документах, прилагаемых к рукописи.
4. Авторы должны заполнить и подписать Сопроводительное письмо, отсканировать и загрузить при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg).

ПОРЯДОК ПУБЛИКАЦИИ РУКОПИСЕЙ

1. Рукопись обязательно проходит первичный отбор на соответствие оформления статьи согласно требованиям журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». В случае несоответствия правилам оформления Редакция вправе отказать в публикации или прислать свои замечания к статье, которые должны быть исправлены Автором перед рецензированием.
2. Все рукописи, прошедшие первичный отбор, направляются по профилю научного исследования на экспертизу и проходят обязательное конфиденциальное рецензирование. Все рецензенты являются признанными специалистами, имеющими публикации по тематике рецензируемой статьи в течение последних 3 лет или в области обработки данных. Рецензирование проводится конфиденциально как для Автора, так и для самих рецензентов. При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией, которая выносит решение, в каком номере журнала будет опубликована статья.
3. Все утвержденные статьи поступают в работу к редактору и корректору.

   Окончательный макет статьи согласовывается с автором.

ЕДИНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «Разработка и регистрация лекарственных средств»

Составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии РФ и «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов.

Оригинальную версию «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов, можно посмотреть на сайте www.ICMJE.org

Проведение и описание всех клинических исследований должно быть в полном соответствии со стандартами CONSORT – http://www.consort-statement.org

ОБЩИЕ ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ

Электронный вариант статьи прилагается в формате А4 Microsof 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
6. ORCID всех авторов статьи.

Резюме и ключевые слова

Объем резюме должен составлять 250–300 слов.

Резюме оригинальной статьи должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Цель (цель работы в сжатой форме).

Материалы и методы (методы исследования, если необходимо, то указать их преимущества по сравнению с ранее применявшимися методическими приемами; характеристика материала).

Результаты (основные результаты исследования).

Заключение (основные выводы).

Резюме обзорной статьи также должно быть структурированным:

Введение (введение работы в сжатой форме).

Текст (описание содержания текста статьи в сжатой форме)

Заключение (основные выводы).

Все аббревиатуры в резюме необходимо раскрывать (несмотря на то, что они будут раскрыты в основном тексте статьи). Текст резюме должен быть связанным, с использованием слов «следовательно», «например», «в результате».

На сайте британского издательства Emerald приведены примеры качественных рефератов для различных типов статей (обзоры, научные статьи, концептуальные статьи, практические статьи – http://www.emeraldinsight.com/authors/guides/write/abstracts.htm?part=2&PHPSESSID=hdac5rtkb73ae013ofk4g8nrv1)

Ключевые слова: (5–8) помещают под резюме после обозначения «Ключевые слова». Ключевые слова должны использовать термины из текста статьи, определяющие предметную область и способствующие индексированию статьи в поисковых системах, и не повторять название статьи.

Вклад авторов. Авторы должны написать информацию о их вкладе в работу (пример: Авторы Х1, Х2 и Х3 придумали и разработали эксперимент, авторы Х4 и Х5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. Х3 и Х4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы Х1 и Х6 участвовали в обработке данных. Автор Х7 проводил теоретические расчеты. Авторы Х1, Х2 и Х7 участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов).

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).

Contribution of the authors. Вклад авторов на английском языке должен соответствовать русскоязычному.

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.

Должен быть переведен текст в таблицах и в рисунках. Текст должен быть и на русском, и на английском языках.

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-производителя 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-производителя, страну происхождения, серию и срок годности [пример: Синдранол 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 необходимо 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 Фармацеутикал Ко.Лтд, Китай, серия KY-RH-M20110116, годен до 27.01.2016 г.].

При описании используемого аналитического оборудования необходимо указывать его название, фирму-производителя и страну происхождения [пример: прибор для теста «Растворение» DT-720 (Erweka GmbH, Германия)].

При описании используемого программного обеспечения необходимо указывать его название, версию, фирму-производителя, 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 используемые статистические критерии имеют ограничения по их применению, указать, как проверялись эти ограничения и каковы результаты проверок. При использовании параметрических критериев описывается процедура проверки закона распределения (например, нормального) и результаты этой проверки.

Точность представления результатов расчетных показателей должна соответствовать точности используемых методов измерения. Средние величины не следует приводить точнее, чем на один десятичный знак по сравнению с исходными данными. Рекомендуется проводить округление результатов (средних и показателей вариабельности) измерения показателя до одинакового количества десятичных знаков, так как их разное количество может быть интерпретировано как различная точность измерений.

Согласно современным правилам, рекомендуется вместо термина «достоверность различий» использовать термин «уровень статистической значимости различий». В каждом конкретном случае рекомендуется указывать фактическую величину достигнутого уровня значимости p для используемого статистического критерия. Если показатель может быть рассчитан разными методами и они описаны в работе, то следует указать, какой именно метод расчета применен (например, коэффициент корреляции Пирсона, Спирмена, бисериальный и т.п.).

Результаты и обсуждение

В разделе в логической последовательности представляются результаты исследования в виде текста, таблиц или рисунков (графики, диаграммы). Следует избегать повторения в тексте данных из таблиц или рисунков. В качестве альтернативы таблицам с большим числом данных используются графики. На графиках и диаграммах рекомендуется указывать доверительный интервал или квадратичное отклонение. На графиках обязательно должны быть подписи и разметка осей, указаны единицы измерений.

В разделе следует выделить новые и важные аспекты результатов проведенного исследования, проанализировать возможные механизмы или толкования этих данных, по возможности сопоставить их с данными других исследователей. Не следует повторять сведения, уже приводившиеся в разделе «Введение», и подробные данные из раздела «Результаты». В обсуждение можно включить обоснованные рекомендации и возможное применение полученных результатов в предстоящих исследованиях.

В обзорных статьях рекомендуется описать методы и глубину поиска статей, критерии включения найденных материалов в обзор.

Заключение

В разделе представляются сформулированные в виде выводов результаты решения проблемы, указанной в заголовке и цели статьи. Не следует ссылаться на незавершенную работу. Выводы работы должны подтверждаться результатами проведенного статистического анализа, а не носить декларативный характер, обусловленный общими принципами.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Указать наличие так называемого конфликта интересов, то есть условий и фактов, способных повлиять на результаты исследования (например, финансирование от заинтересованных лиц и компаний, их участие в обсуждении результатов исследования, написании рукописи и т.д.).

При отсутствии таковых использовать следующую формулировку: «Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи».

Источник финансирования

Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется. При отсутствии источника финансирования использовать следующую формулировку: «Авторы заявляют об отсутствии финансирования».

Соответствие принципам этики

Научно-исследовательские проекты с участием людей должны соответствовать этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все лица, участвующие в исследовании, должны дать информированное согласие на участие в исследовании. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие.

Научно-исследовательские проекты, требующие использования экспериментальных животных, должны выполняться с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) 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.). Название русскоязычных журналов в REFERENCES дается в *транслитерации, затем ставится знак = и дается английское название журнала* (не нужно самостоятельно переводить русское название журнала на английский язык, можно указать лишь ту версию названия на английском языке, которая, как правило, имеется на англоязычном сайте этого журнала. Если же ее нет, можно ограничиться транслитерацией).

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. Литература

Насырова Р. Ф., Иванов М. В., Незнанов Н. Г. Введение в психофармакогенетику. СПб.: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева; 2015. 272 с.

References

Nasyrova R. F., Ivanov M. V., Neznanov N. G. *Vvedenie v psikhofarmakogenetiku* [Introduction to psychophar-macogenetics]. St. Petersburg: Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V. M. Bekhtereva; 2015. 272 p. (In Russ.).

2. Литература

Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Онкология*. 2013;15(1):20–23

References

Kolesnik A. P. Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer. *Onkologiya*. 2013;15(1):20–23. (In Russ.).

3. Литература

Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

References

Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117.

4. Литература/References

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.

5. Литература/References

Cornier M. A., Dabelea D., Hernandez T. L., Lindstrom R. C., Steig A. J., Nicole R. S., Van Pelt R. E., Wang H., Eckel R. H. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008;29(7):777–822. DOI: 10.1210/er.2008–0024.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. Список литературы должен соответствовать формату, рекомендуемому Американской Национальной Организацией по Информационным стандартам (National Information Standards Organisation – NISO), принятому National Library of Medicine (NLM) для баз данных (Library's MEDLINE/PubMed database) NLM: http://www. nlm.nih.gov/citingmedicine.

Названия периодических изданий могут быть написаны в сокращенной форме в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine (NLM Catalog). Обычно эта форма написания самостоятельно принимается изданием; ее можно узнать на сайте издательства либо в списке аббревиатур Index Medicus. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя. 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

Литература

Соколова Г. Н., Потапова В. Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис; 2009. 328 с.

References

Sokolova G. N., Potapova V. B. *Kliniko-patogeneticheskie aspekty yazvennoy bolezni zheludka* [Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis; 2009:328 p. (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 p.

Статья из журнала

Выходные данные указываются в следующей последовательности: автор(ы) (фамилии и инициалы всех авторов). Название статьи. Название журнала (курсивом). Год; том (в скобках номер журнала): цифры первой и последней страниц.

Образец оформления

Для русскоязычных источников

Литература

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.

References

Shishkin S. V., Mustafina S. V., Shcherbakova L. V., Simonova G. I. Metabolic syndrome and risk of stroke in the population of Novosibirsk. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2014;13(3):53–57. (In Russ.)..

Для англоязычных источников

Dickerson F. B., Brown C. H., Kreyenbulh J. A., Fang L., Goldberg R. W., Wohlheiter K., Dixon L.B . Obesity among individuals with serious mental illness. Acta Psychiatr Scand. 2006;113(4):306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.

Варианты библиографического описания материалов конференций: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7272/

Варианты библиографического описания патентов: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7260/

Варианты библиографического описания ресурсов удаленного доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/

DOI

Во всех случаях, когда у цитируемого материала есть цифровой идентификатор Digital Object Identifier (DOI), его необходимо указывать в самом конце библиографической ссылки. Проверять наличие DOI статьи следует на сайте http://search.crossref.org/ или https://www. citethisforme.citethisforme.com.

Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке. Данный сайт, помимо DOI, автоматически генерирует правильно оформленное библиографическое описание статьи на английском языке в стиле цитирования AMA. Подавляющее большинство зарубежных журнальных статей с 2000 г. и многие русскоязычные статьи (опубликованные после 2013 г.) зарегистрированы в системе CrossRef и имеют уникальный DOI. За достоверность и правильность оформления представляемых библиографических данных авторы несут ответственность вплоть до отказа в праве на публикацию.

ТАБЛИЦЫ И РИСУНКИ

Таблицы и рисунки должны быть представлены на русском и английском языках.

Таблицы

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок на русском и английском языке и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию.

Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Для сноски применяется символ *. Если используются данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, должно быть полностью приведено его название.

Рисунки

Все рисунки (диаграммы, фотографии) нумеруются. В тексте должна быть ссылка на соответствующий рисунок.

Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

Если рисунки ранее уже публиковались, необходимо указать оригинальный источник, представить письменное разрешение на их воспроизведение от держателя прав на публикацию.

Список подрисуночных подписей на русском и английском языках размещается в конце статьи.

Рисунки представляются отдельными файлами в формате *tif, *jpg, *cdr, *ai. с разрешением не менее 300 dpi.

Каждый файл именуется по фамилии первого автора и номеру рисунка.

pharmtech & ingredients

a Hyve event

Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства

International exhibition
of equipment, raw materials
and technologies for
pharmaceutical production

Забронируйте стенд
Book your stand

23-26 НОЯБРЯ 2021
NOVEMBER

Россия, Москва
МВЦ «Крокус Экспо»
Crocus Expo IEC, Moscow, Russia

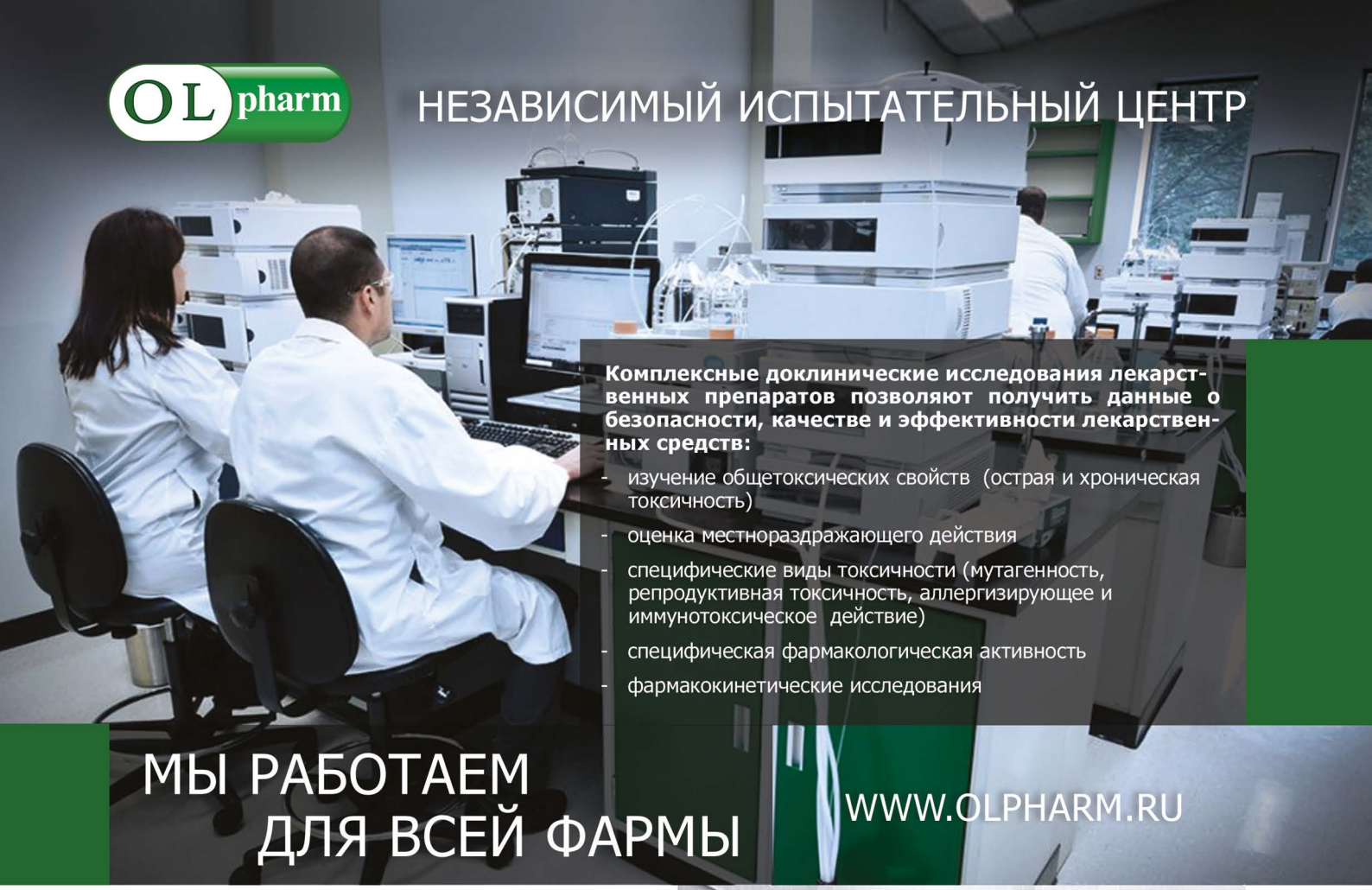
pharmtech-expo.ru

+7 (495) 799-55-85
pharmtech@hyve.group

0+

OL pharm

НЕЗАВИСИМЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри

Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30.04.2009 на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 групп патогенности

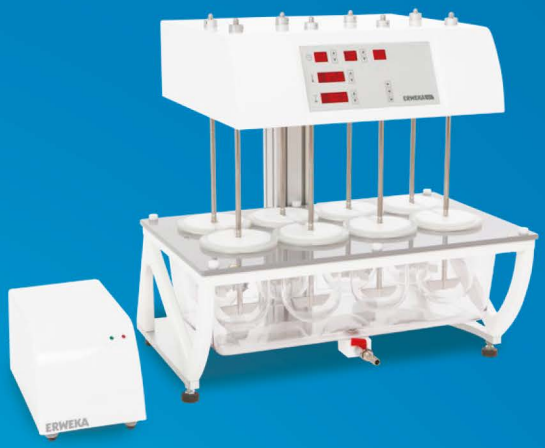
ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

Серия тестеров растворения

ERWEKA DT light

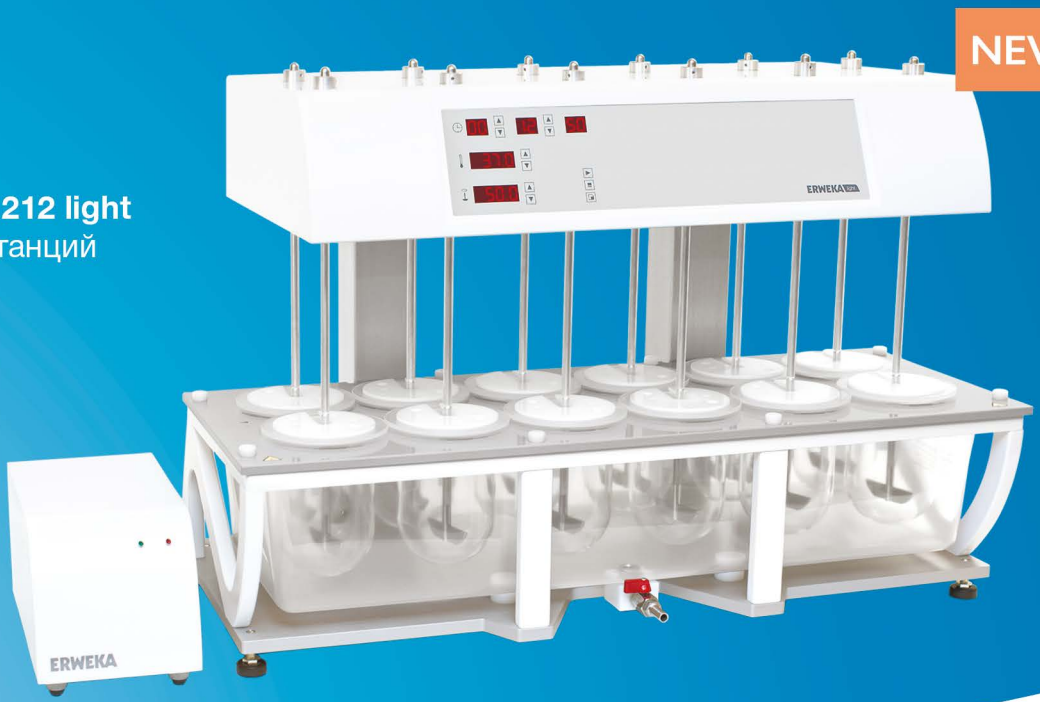
Экономичные тестеры с ручным отбором проб

DT 126 light
6 станций



DT 128 light
8 станций

NEW



DT 1212 light
12 станций

ООО «ЭРВЕКА»
Тел.: +7 (499) 110 90 60
sales@erweka-russia.ru

ERWEKA light