WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ВНЕСЕН В ПЕРЕЧЕНЬ
ВАК Scopus

RESEARCH & PRODUCTION JOURNAL

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

2021. Том 10, № 2   2021. Volume 10, No. 2

18+

Summum bonum medicinae sanitas

WWW.PHARMJOURNAL.RU

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Научно-производственный журнал

2021. Том 10, № 2

DRUG DEVELOPMENT & REGISTRATION

Research & production journal

2021. Volume 10, No. 2

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.

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. www.pharmjournal.ru 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.

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 www.pharmjournal.ru 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 (cc) BY 4.0
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

Регуляторные вопросы

CONTENTS

Regulatory Issues

Редакционная статья / Editorial article

Ежегодная конференция с международным участием «Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств» состоится в Москве 25 июня

Конференция состоится 25 июня в Москве в живом формате. Организаторами конференции выступают ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и научно-производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».

Annual conference with international participation "Development and registration of biotechnological drugs" will be held in Moscow on June 25

The conference will take place on June 25 in Moscow in a live format. The conference is organized by LLC "CPHA" and the scientific and production journal Drug development & registration.

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас и Ваших коллег посетить ежегодное бесплатное мероприятие, традиционно организуемое нашим изданием.

В этот раз уже многим полюбившаяся ежегодная научно-практическая конференция состоится в живом формате. Мероприятие пройдет 25 июня в г. Москве. Организаторами конференции традиционно выступают **ООО «Центр Фармацевтической Аналитики»** и научно-производственный журнал **«Разработка и регистрация лекарственных средств»**.

В этот раз мы поговорим о жизненном цикле биотехнологических лекарственных средств. В рамках мероприятия будут освещаться научные аспекты разработки, вопросы исследований различных групп биотехнологических лекарственных средств, таких как моноклональные антитела, низкомолекулярные гепарины, инсулины, пептидные препараты и другие, а также производственная часть и регуляторные вопросы.

Лекторами конференции выступают представители академической общественности, фармацевтических предприятий, а также регуляторных органов. Кроме того, будет представлено современное оборудование, предназначенное для проведения исследований биотехнологических препаратов.

Когда: 25 июня 2021 г.

Где: г. Москва, Технопарк «КАЛИБР».

Организаторы: info@pharmjournal.ru.

Стоимость: бесплатно.

Для посещения мероприятия необходимо заполнить форму регистрации.

Рекламная статья / Sponsored article

Применение нового автосамплера для ввода равновесной газовой фазы TriPlus 500 (Thermo Scientific) для анализа остаточных растворителей в соответствии с методом USP <467>

Статья предоставлена компанией «АВРОРА»

Органические растворители широко используются в синтезе фармацевтических продуктов и не всегда могут быть полностью удалены в процессе производства. Для обеспечения безопасности конечные продукты тестируются на остаточное содержание растворителей, используемых в производственных процессах, насколько они эффективно удалены или, если они все еще присутствуют, находится ли их концентрация в допустимых пределах. Результаты, представленные в этой работе, демонстрируют, что новый автоматический пробоотборник TriPlus 500 HS в сочетании с Trace 1310 GC и детектором ПИД обеспечивает необходимую производительность для анализа остаточных растворителей в фармацевтических продуктах, и соответствует всем требования метода USP <467> или даже превосходит их.

Applying the New Autosampler to Enter the Equilibrium Gas Phase TriPlus 500 (Thermo Scientific) for the Analysis of Residual Solvents According to USP Method <467>

The article is presented by the company "AURORA"

Organic solvents are widely used in the synthesis of pharmaceutical products and cannot always be completely removed during the manufacturing process. To ensure safety, the end products are tested for the residual content of solvents used in manufacturing processes, how efficiently they are removed or, if they are still present, whether their concentration is within acceptable limits. The results presented in this paper demonstrate that the new TriPlus 500 HS autosampler, combined with the Trace 1310 GC and FID detector, provides the performance needed for the analysis of residual solvents in pharmaceutical products, meeting or exceeding USP <467> method requirements.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Органические растворители широко используются в синтезе фармацевтических продуктов и не всегда могут быть полностью удалены в процессе производства. Для обеспечения безопасности конечные продукты тестируются на остаточное содержание растворителей, используемых в производственных процессах, насколько они эффективно удалены или, если они все еще присутствуют, находится ли их концентрация в допустимых пределах.

Согласно руководящим принципам Международной конференции по гармонизации (ICH)[1], метод USP <467>[2] , а так же ГФ XIV (ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители»), описывает процедуру анализа и классифицирует остаточные растворители на основе их токсичности, устанавливая пределы концентрации в зависимости от опасности для здоровья:

- класс 1: растворители с недопустимой токсичностью;
- класс 2: растворители с меньшей токсичностью;
- класс 3: малотоксичные растворители.

Поскольку органические растворители имеют относительно низкие температуры кипения и термически стабильны, предпочтительным аналитическим методом для определения остаточного растворителя класса 1 и класса 2 является отбор проб равновесной газовой фазы и анализ методом газовой хро-

[1] Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R6), ICH Harmonised Guidelines, International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human use. 2016.

[2] General Chapter USP <467> Organic Volatile impurities, Chemical Tests, United States Pharmacopeia. 2012.

матографиии (HS-GC) с пламенно-ионизационным детектором (FID) или масс-спектрометрометром (МС) в качестве детектора. Растворители класса 3 можно определять неспецифическим методом, таким как потеря веса при высушивании.

Отбор проб равновесной газовой фазы позволяет извлекать полулетучие и летучие соединения из сложных жидких и твердых матриц быстрым и простым способом без необходимости трудоемкой подготовки проб.

Новый автосамплер Triplus 500 HS предлагает инновационную конструкцию пневматического контура с прямым соединением между нагретым клапаном и колонкой для ГХ. Это обеспечивает высокоточное введение образца и отличную воспроизводимость площади пика. Кроме того, непрерывная продувка тракта отбора пробы обеспечивает надежность системы, снижает риск загрязнения и кросс-переноса (важно при анализе высококипящих остаточных растворителей). В этом исследовании представлены результаты анализа остаточных растворителей в соответствии с критериями USP <467>, полученные с помощью автосамплера TriPlus 500 HS и газового хроматографа Trace 1310 с быстрозаменяемыми модулями (Instant Connect Module) SSL инжектора и ПИД в качестве детектора. Соответствие системы USP <467>, чувствительность, точность, надежность и линейность оценивались в соответствии с рабочим процессом, описанным в методе USP <467> как для водорастворимых, так и нерастворимых в воде фармацевтических продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Во всех экспериментах автоматический пробоотборник TriPlus 500 HS был соединен с ГХ Thermo Scientific TRACE™ 1310, оснащенным инжектором Thermo Scientific™ Instant Connect Split/Splitless SSL и детектором Thermo Scientific™ Instant Connect FID.

Хроматографическое разделение целевых аналитов проводили на колонке для ГХ Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-624, 30 м × 0,32 мм × 1,8 мкм для процедуры A и C, и на Thermo Scientific™ TraceGOLD™ колонка для ГХ TG-WAXMS, 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм для процедуры B. Рабочие условия HS-GC-FID в соответствии с методом USP <467> приведены в таблицах 1 и 2.

Сбор, обработка и отчетность данных

Данные были получены, обработаны и предоставлены с использованием программного обеспечения Thermo Scientific™ Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS)[1], версия 7.2, программной платформы, соответствующей Разделу 21 Свода федеральных правил, часть 11. Интегрированное управление приборами обеспечивает полную автоматизацию от настройки прибора до обработки полученных данных, создания отчетов и хранения. Упрощенные электронные рабочие процессы (eWorkflows) обеспечивают эффективное управление данными, гарантируя простоту использования, целостность и отслеживаемость данных.

[1] Thermo Fisher Scientific, Chromeleon CDS Enterprise – Compliance, Connectivity, Confidence, BR72617-EN 0718S.

Таблица 1. **Аналитические параметры ГХ-ПИД для ГХ TRACE 1310, используемого для определения остаточного содержания растворителей в соответствии с методом USP <467>, процедуры: A, B, C**

Table 1. **Analytical parameters of the GC-FID for the TRACE 1310 GC used to determine the residual level of solvents according to USP method <467>, procedures: A, B, C**

Параметры хроматографа Trace 1310 Chromatograph parameters Trace 1310		
	Процедура A/C **Procedure A/C**	**Процедура B** **Procedure B**
Инжектор и режим Injector and mode	Сплит/сплитлесс, сплит (с расщеплением потока) Split/splitless, split (with split stream)	
Расщепление потока Splitting the stream	10:1	20:1
Режим обдува септы, поток Septum blowing mode, flow	Постоянный, 5 мл/мин Continuous, 5 ml/min	
Газ-носитель, режим, поток Carrier gas, mode, flow	Гелий, постоянный поток, 2,2 мл/мин Helium, constant flow, 2.2 ml/min	
Температурная программа колонки **Column temperature program**	**Процедура A/C** **Procedure A/C**	**Процедура B** **Procedure B**
Температура 1, °C Temperature 1, °C	40	50
Время задержки, мин Delay time, min	20	20
Температура 2, °C Temperature 2, °C	240	165
Скорость подъема, °C/мин Lifting speed, °C/min	10	6
Время задержки, мин Delay time, min	20	20
Пламенно-ионизационный детектор **Flame ionization detector**		
Температура, °C Temperature, °C	250	
Скорость потока воздуха, мл/мин Air flow rate, ml/min	350	
Скорость потока водорода, мл/мин Hydrogen flow rate, ml/min	35	
Скорость потока газа поддува, мл/мин Blowing gas flow rate, ml/min	40	
Скорость сбора данных, Гц Data collection rate, Hz	25	

Таблица 2. **Используемые аналитические параметры автосамплера TriPlus 500 HS для определения остаточного содержания растворителя в соответствии с методом USP <467>, процедуры: A, B, C**

Table 2. **Analytical parameters of the TriPlus 500 HS autosampler used for the determination of the residual solvent content according to the USP method <467>, procedures: A, B, C**

Параметры автосамплера TriPlus 500 HS TriPlus 500 HS Autosampler Parameters	
Температура инкубации, °C Incubation temperature, °C	80
Время инкубации, мин Incubation time, min	60
Перемешивание виал Mixing vials	Fast
Режим прессуризации виал Vial pressurization mode	Pressure
Давление в виале, кПа (доп. газ азот) Vial pressure, kPa (additional gas nitrogen)	130
Время уравновешивания давления, мин Pressure equilibration time, min	1
Объем петли, мл Loop volume, ml	1
Температура петли/интерфейса, °C Loop/interface temperature, °C	80
Давление заполнения петли, кПа Loop filling pressure, kPa	72,4
Время балансировки петли, мин Loop balancing time, min	1
Уровень потока продувки петли Loop purge flow level	2
Режим ввода Input mode	Standard
Время инжекции, мин Injection time, min	1

Подготовка стандартных и референсных образцов

Растворы остаточных растворителей класса 1, класса 2А и класса 2В в диметилсульфоксиде (ДМСО) по USP <467> были получены от Restek. Исходные и стандартные растворы для процедур A, B, C разбавляли водой или ДМСО, как указано в методе USP <467>[1]. В качестве разбавителей использовали воду для ВЭЖХ-МС и диметилсульфоксид для газовой хроматографии (ДМСО, чистота ≥99,9 %). Приобретенный без рецепта аспирин (ацетилсалициловая кислота, 75 мг) и таблетки для снятия боли (парацетамол, 500 мг и кофеин, 65 мг) использовали для приготовления исходных образцов и растворов для испытаний, как описано в документации. Для тестирования всего рабочего процесса USP <467> был приготовлен второй запас тестовых растворов с уровнем концентрации, в пять раз превышающим пределы, указанные в таблице 3, которые представляют собой приемлемое количество остаточных растворителей в конечном продукте.

[1] General Chapter USP <467> Organic Volatile impurities, Chemical Tests, United States Pharmacopeia. 2012.

Таблица 3. **Пределы концентрации в ppm для остаточных растворителей класса 1, класса 2А и класса 2В**

Table 3. **Concentration limits in ppm for residual solvents of class 1, class 2A and class 2B**

Наименование вещества Name of substance	Предел обнаружения (ppm) Detection limit (ppm)
Класс 1 Class 1	
1,1-трихлорэтен 1,1-trichlorethene	8
1,1,1-трихлорэтан 1,1,1-trichloroethane	1500
Четыреххлористый углерод Carbon tetrachloride	2
Бензол Benzene	4
1,2-дихлорэтан 1,2-dichloroethane	5
Класс 2А Class 2A	
Метанол Methanol	300
Ацетонитрил Acetonitrile	410
Дихлорметан Dichloromethane	600
Транс-1,2-дихлорэтен *Trans*-1,2-dichloroethene	1870
Цис-1,2-дихлорэтен *Cis*-1,2-dichloroethene	1870
Тетрагидрофуран Tetrahydrofuran	720
Циклогексан Cyclohexane	3880
Метилциклогексан Methylcyclohexane	1180
1,4-диоксан 1,4-dioxane	380
Толуол Toluene	890
Хлорбензол Chlorobenzene	360
Ксилолы* Xylenes*	2710
Класс 2В Class 2B	
Гексан Hexane	290
Нитрометан Nitromethane	50
Хлороформ Chloroform	60
1,2-диметоксиэтан 1,2-dimethoxyethane	100
Трихлорэтен Trichlorethene	80
Пиридин Pyridine	200
2-гексанон 2-hexanone	50
Тетралин Tetralin	100

Примечание. *Обычно 60 % *м*-ксилола, 14 % *п*-ксилола, 9 % *о*-ксилола, 17 % этилбензола.

Note. *Usually 60 % *m*-xylene, 14 % *p*-xylene, 9 % o-xylene, 17 % ethylbenzene.

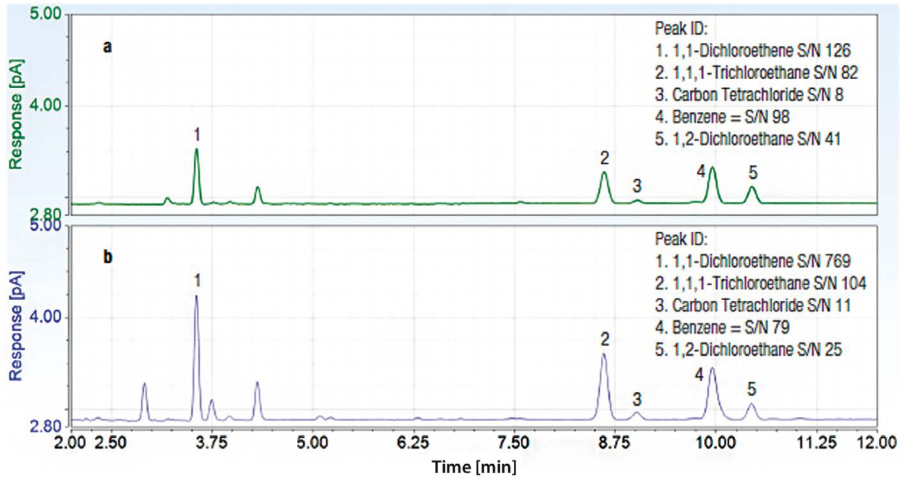


Рисунок 1. **Пиковое отношение сигнал/шум (S/N) для растворов пригодности системы класса 1 для водорастворимых (a) и нерастворимых в воде (b) продуктов. Пики без аннотации не могли быть идентифицированы по данным ПИД**

Figure 1. **Peak signal-to-noise ratio (S/N) for class 1 system suitability solutions for water-soluble (a) and water-insoluble (b) products. Peaks without annotation could not be identified from PID data**

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура А: проверка и идентификация остаточного растворителя

Стандартные растворы класса 1 и класса 2А, а также тестовые растворы класса 1 для подтверждения пригодности системы для водорастворимых и нерастворимых в воде фармацевтических препаратов готовили с использованием 20 мл виал с герметичными крышками. Были выполнены следующие критерии эффективности метода USP <467> для водорастворимых и водонерастворимых продуктов:

- Отношение сигнал/шум (S/N) для 1,1,1-трихлорэтана в стандартном растворе класса 1 было >5 : 1, и все пики в пригодности системы класса 1 показали S/N > 3 : 1 (рисунок 1). Расчет отношения сигнал/шум PtP производился автоматически в Chromeleon CDS в соответствии с методом, описанным в USP <621> Раздел пригодности системы[1].
- Хроматографическое разрешение (Rs) между критической парой, ацетонитрилом и дихлорметаном было автоматически рассчитано с использованием системы хроматографических данных с применением формулы для электронного интегратора, приведенной в разделе пригодности системы USP <621>[2], и подтвержденной как >1, что соответствует требованиям критерия приемки в соответствии с требованиями нормативной документации (рисунок 2).

[1] General Chapter USP <621> Chromatography, Physical Tests, United States Pharmacopeia, First Supplement to USP 40-NF 35. 2017.

[2] Там же.

Тестирование фармацевтического продукта, соответствующего требованиям процедуры А

Фармацевтические продукты (диспергированные таблетки для снятия боли с аспирином и парацетамолом) были проанализированы без добавления остаточного растворителя. Результаты были сравнены со стандартными растворами и подтвердили, что все растворители, использованные в процессе производства, были эффективно удалены, поскольку не было обнаружено никаких остаточных растворителей (рисунок 3). В качестве примера профиль пика, полученный для диспергированного раствора без добавок аспирина (зеленый) по сравнению со стандартным раствором класса 2А (синий), представлен на рисунке 3.

Проверка фармацевтического продукта, не прошедшего процедуру А

В фармацевтические продукты (диспергированные таблетки для снятия боли аспирин и парацетамол) добавляли остаточные растворители и вводили в хроматографическую систему. Результаты сравнивали со стандартными растворами. Поскольку пики, обнаруженные в образцах с добавками, превышали пределы, указанные в таблице 2, этап подтверждения соединения был обязательным, как описано в процедуре В. В качестве примера профиль пика, полученный для диспергированного раствора с добавлением аспирина (зеленый) по сравнению со стандартным раствором класса 2А (синий), показан на рисунке 4. Пики остаточного растворителя класса 2А, обнаруженные в растворе пробы с добавкой, показали более высокие площади пиков по сравнению с пиками в соответствующем стандартном растворе класса 2А.

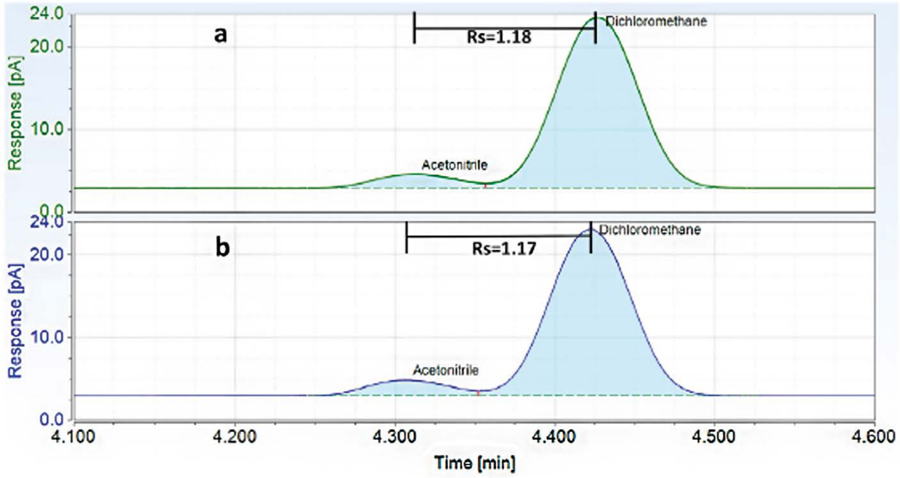


Рисунок 2. **Хроматографическое разрешение (Rs) между ацетонитрилом и дихлорметаном для водорастворимых (a) и нерастворимых в воде продуктов (b). Разрешение соответствовало нормативным требованиям (Rs ≥ 1,0) с расчетными значениями 1,18 и 1,17 для водорастворимых и нерастворимых в воде фармацевтических препаратов соответственно**

Figure 2. **Chromatographic resolution (Rs) between acetonitrile and dichloromethane for water-soluble (a) and water-insoluble products (b). Resolution met regulatory requirements (Rs ≥ 1.0) with calculated values of 1.18 and 1.17 for water-soluble and water-insoluble pharmaceuticals, respectively**

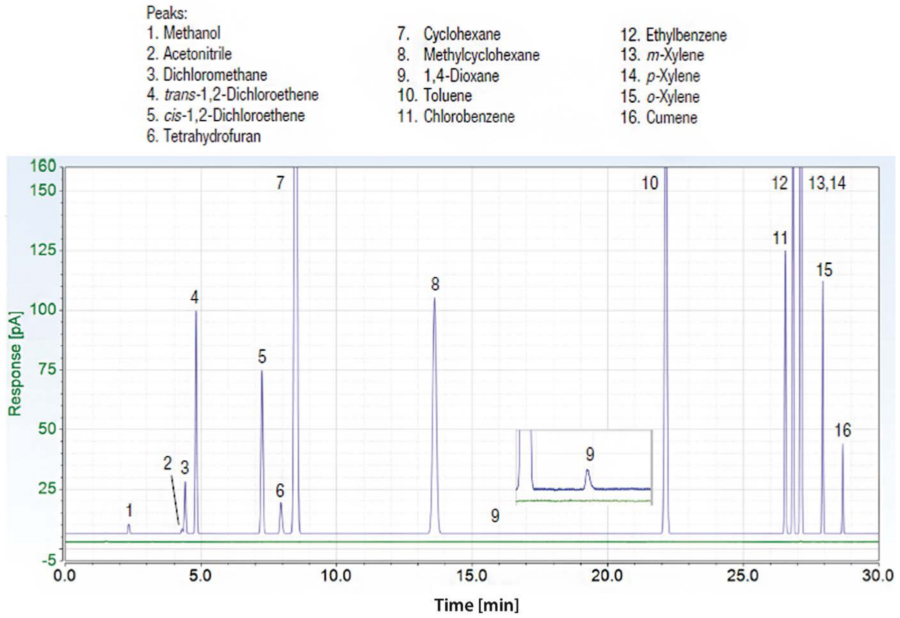


Рисунок 3. **Сравнение стандартного раствора класса 2A (синий) и ацетилсалицилового раствора (зеленый). Критерии соблюдены, поскольку в исследуемом образце не было обнаружено пиков остаточного растворителя**

Figure 3. **Comparison of a class 2A standard solution (blue) and an acetylsalicylic solution (green). The criteria were met as no residual solvent peaks were found in the test sample**

Процедура B: идентификация пика

В соответствии с USP <467> для процедуры B хроматографическая колонка для ГХ TraceGOLD TG-624 была заменена колонкой WAX (колонка TraceGOLD TGWAXMS GC, 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). Стандартные растворы класса 1 и класса 2A, а также тестовые растворы класса 1 для подтверждения пригодности системы для водорастворимых и нерастворимых в воде фармацевтических препаратов были проанализированы с использованием параметров, представленных в таблице 1.

Требования к чувствительности и разрешающей способности системы были оценены для процедуры B:

- S/N PtP для бензола в стандартном растворе класса 1 составляет >5 : 1, и все пики в пригодности системы класса 1 показали, что отношение

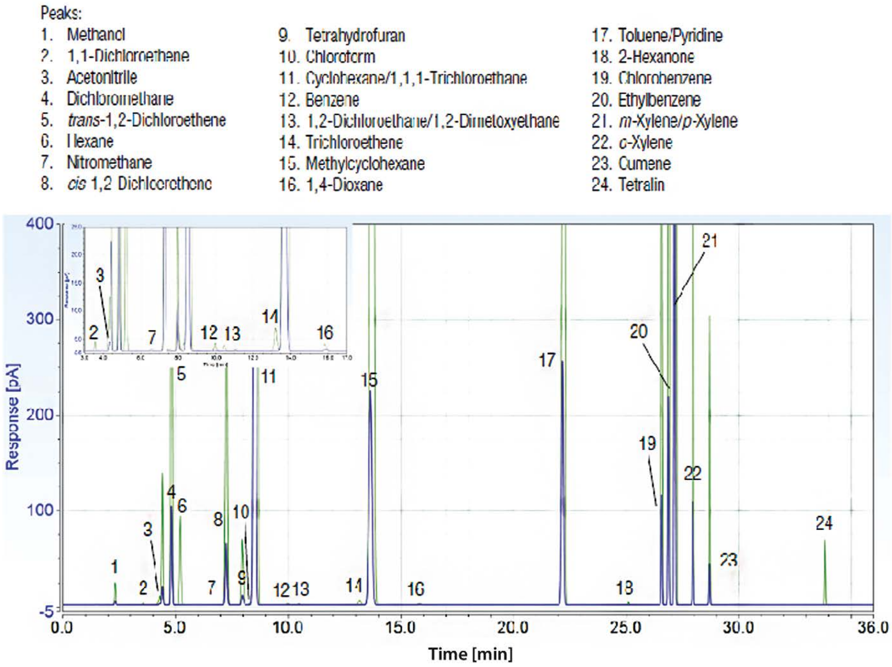


Рисунок 4. Сравнение профилей пиков, полученных для водорастворимого тестового раствора с добавками (зеленый) и стандартного раствора класса 2А (синий). Пики класса 2А в добавленном растворе показали более высокие отклики по сравнению со стандартным раствором класса 2А. Неидентифицированные зеленые пики принадлежали остаточным растворителям класса 1 или 2В

Figure 4. Comparison of peak profiles obtained for a water-soluble test solution with additives (green) and a standard solution of class 2A (blue). The Grade 2A peaks in the added solution showed better responses compared to the standard Grade 2A solution. Unidentified green peaks belonged to residual class 1 or 2B solvents

S/N > 3 : 1 удовлетворяет нормативным требованиям (рисунок 5). Расчет S/N производился системой данных автоматически в соответствии с методом, описанным в разделе пригодности системы USP <621>.

- Критическая пара *цис*-1,2-дихлорэтен и ацетонитрил определена по базовой линии с хроматографическим разрешением 3,8 и 3,9 для водорастворимых и водонерастворимых стандартных растворов класса 2А соответственно (рисунок 6), что соответствует требуемым критериям приемлемости (Rs ≥ 1,0). Хроматографическое разрешение было автоматически определено в Chromeleon CDS путем применения формулы для электронного интегратора, указанной в разделе пригодности системы USP <621>.

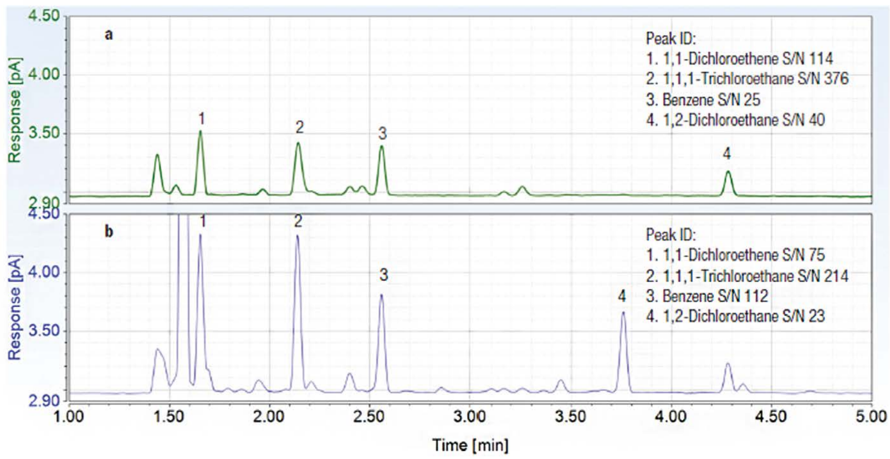


Рисунок 5. Отношения пик-к-пику для растворов пригодности системы класса 1 для водорастворимых (а) и нерастворимых в воде (b) продуктов. Пики без аннотации не могут быть подтверждены данными FID

Figure 5. Peak-to-peak ratios for class 1 system suitability solutions for water-soluble (a) and water-insoluble (b) products. Peaks without annotation cannot be validated by FID data

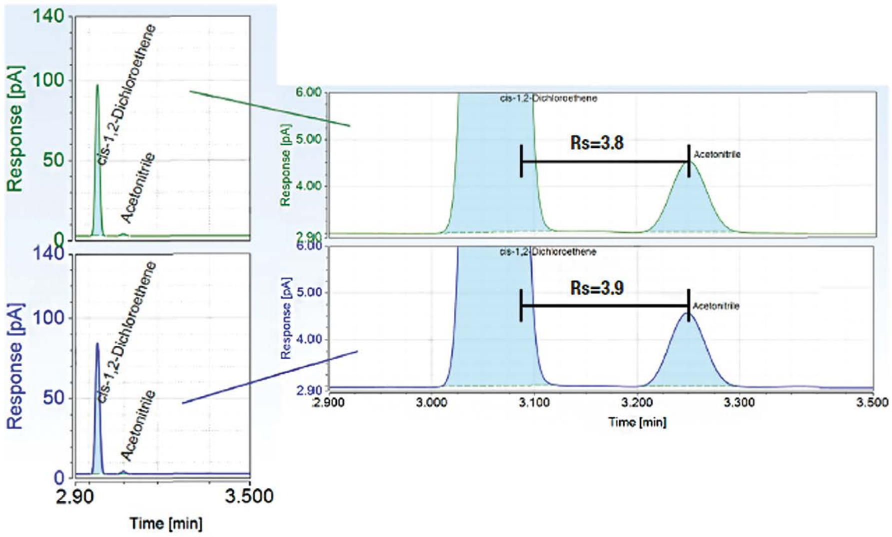


Рисунок 6. Хроматографическое разрешение для критической пары *цис*-1,2-дихлорэтен/ацетонитрил для водорастворимых (вверху) и нерастворимых в воде продуктов (внизу). Пики разрешены по базовой линии и соответствуют требованиям хроматографического разрешения USP <467> (Rs ≥ 1,0)

Figure 6. Chromatographic resolution for the *cis*-1,2-dichloroethene/acetonitrile critical pair for water-soluble (top) and water-insoluble products (bottom). Peaks are resolved by type and meet the requirements of the chromatographic standard USP <467> resolution (Rs ≥ 1.0)

Проверка соответствия фармацевтического продукта

Подтверждение процедуры B

Стандартные растворы класса 1, класса 2А, класса 2В и тестовые растворы с добавками для водорастворимых и водонерастворимых фармацевтических препаратов вводили в хроматографическую систему, и сравнивали профили пиков.

Идентифицированные пики (процедура А) были подтверждены (процедура В), поскольку их отклики были выше, чем соответствующие стандарты. Следовательно, необходимо определить уровни этих остаточных растворителей (процедура С).

Хроматографический профиль водорастворимого раствора с добавкой и стандартного раствора класса 2А представлен в качестве примера на рисунке 7.

Процедура С: количественная оценка

В хроматографическую систему вводили стандартные растворы класса 1, класса 1 соответствия системы и класса 2А. Параметры HS-GC, применяемые для процедуры С, приведены в таблице 1. Требования к соотношению сигнал-шум (S/N) и хроматографическому разрешению (Rs) для решения по пригодности системы класса 1, класса 1 и стандартного решения класса 2А были такими же, как и описан, и оценен в процедуре А.

Стандартные растворы классов 1, 2А, 2В и тестовые растворы для количественного определения были разбавлены, как описано в USP <467>, и введены в хроматографическую систему. Например, профиль пика аспирина с добавками по сравнению со стандартным тестовым раствором показан на рисунке 8.

Расчетное количество каждого остаточного растворителя (в ppm), идентифицированное с помощью процедуры А и подтвержденное в процедуре В, было получено с применением формулы, приведенной в нормах USP <467> для водорастворимых и нерастворимых в воде фармацевтических препаратов. Расчетные концентрации соответствовали уровням, стандартных добавок к образцам.

Воспроизводимость системы

Воспроизводимость системы оценивалась на $n = 18$ последовательных инжекциях для стандартных растворов класса 1, класса 2А и класса 2В. Стандартные растворы разбавляли водой или ДМСО в соответствии с процедурой А для водорастворимых и водонерастворимых продуктов соответственно. Подготовка образцов сыграла решающую роль для тестируемых неполярных растворителей с высокими коэффициентами распределения. В результате низкого сродства к воде %RSD были выше, когда концентрированные стандартные растворы разбавляли водой по отношению к ДМСО.

Значения СКО в % площади пика, полученные для остаточных растворителей класса 1, класса 2А и класса 2В, представлены в таблице 4 со средними значениями <3 % для всех классов остаточных растворителей, когда в качестве разбавителя использовались вода и ДМСО.

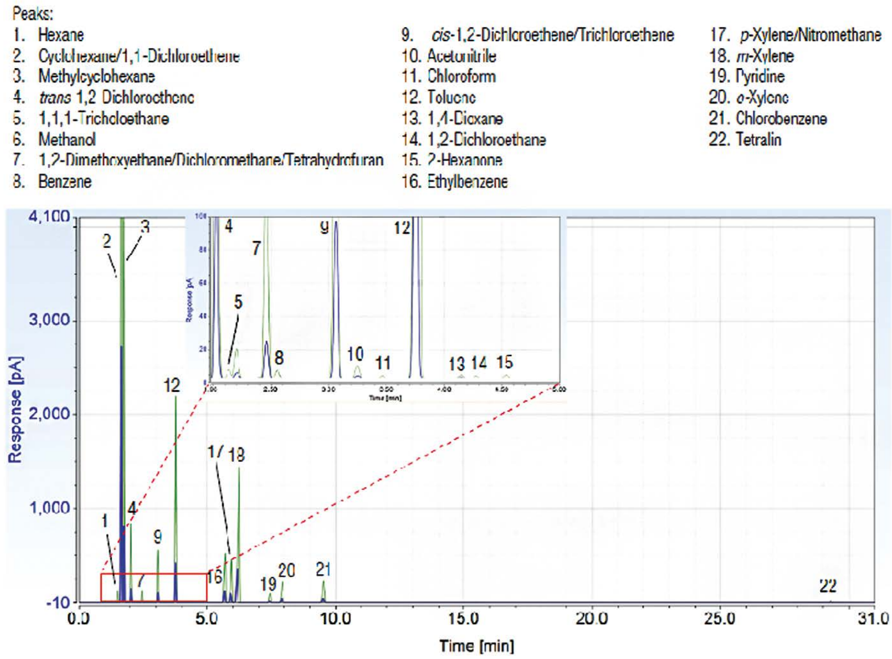


Рисунок 7. **Сравнение профилей пиков, полученных для водорастворимого раствора пробы с добавками (зеленый) и стандартного раствора класса 2А (синий). Пики класса 2А в добавленном растворе показали более высокие отклики по сравнению со стандартным раствором класса 2А. Неидентифицированные зеленые пики принадлежали остаточным растворителям класса 1 или 2В**

Figure 7. Comparison of peak profiles obtained for a water-soluble sample solution with additives (green) and a standard solution of class 2A (blue). The Grade 2A peaks in the added solution showed better responses compared to the standard Grade 2A solution. Unidentified green peaks belonged to residual class 1 or 2B solvents

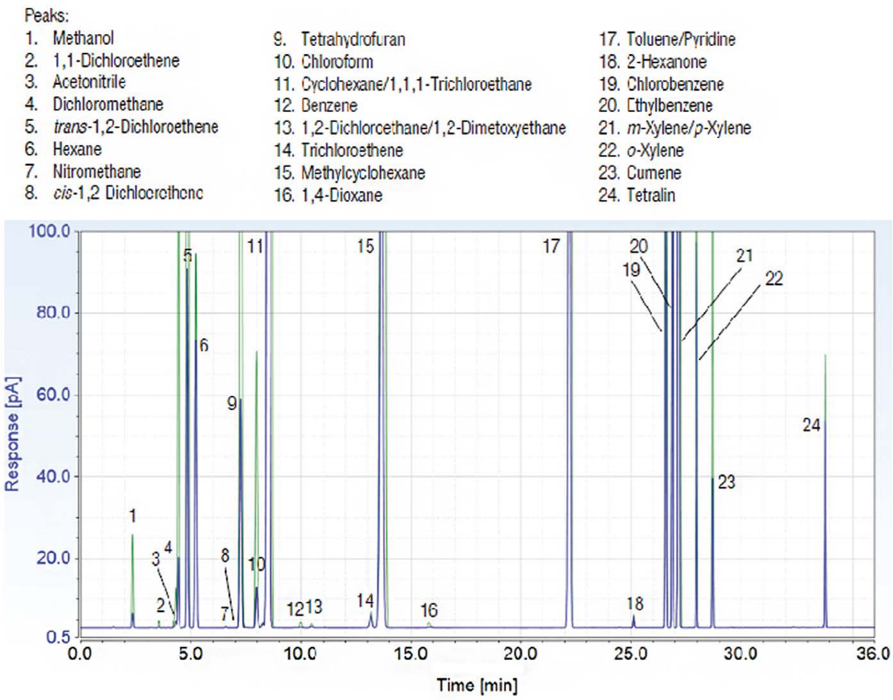


Рисунок 8. **Сравнение профилей пиков, полученных для раствора аспирина с добавкой (зеленая хроматограмма) и стандартного исследуемого раствора (синяя хроматограмма). Пики классов 1, 2А и 2В в растворе пробы с добавлением показали более высокие отклики по сравнению со стандартным тестовым раствором**

Figure 8. Comparison of peak profiles obtained for an aspirin supplemented solution (green chromatogram) and a standard test solution (blue chromatogram). Classes 1, 2A, and 2B peaks in the doped sample solution showed better responses compared to the standard test solution

Таблица 4. **Площадь пиков %RSD, полученная при n = 18 последовательных инъекциях с использованием воды и ДМСО в качестве разбавителей для концентрированных стандартных растворов. Среднее значение %RSD для оценок <3 % для всех классов остаточных растворителей**

Table 4. **Peak area %RSD obtained at n = 18 consecutive injections using water and DMSO as diluents for concentrated standard solutions. Average %RSD for ratings <3 % for all residual solvent classes**

Окончание табл. 4

Название вещества Substance name	СКО% (n = 18) %RMS (n = 18)	
Класс 1 **Class 1**	**Растворитель: вода** **Solvent: water**	**Растворитель: ДМСО** **Solvent: DMSO**
1,1-трихлорэтен 1,1-trichlorethene	1,5	0,7
1,1,1-трихлорэтан 1,1,1-trichloroethane	4,0	0,8
Четырехлористый углерод Carbon tetrachloride	1,9	2,9
Бензол Benzene	0,8	0,9
1,2-дихлорэтан 1,2-dichloroethane	1,6	1,0
Среднее СКО% Average standard deviation %	2,0	1,3
Класс 2А **Class 2A**	**Растворитель: вода** **Solvent: water**	**Растворитель: ДМСО** **Solvent: DMSO**
Метанол Methanol	0,7	1,4
Ацетонитрил Acetonitrile	0,8	1,6
Дихлорметан Dichloromethane	3,1	0,7
Транс-1,2-дихлорэтен *Trans*-1,2-dichloroethene	4,0	1,2
Цис-1,2-дихлорэтен *Cis*-1,2-dichloroethene	3,4	0,8
Тетрагидрофуран Tetrahydrofuran	0,9	1,4
Циклогексан Cyclohexane	3,6	2,8
Метилциклогексан Methylcyclohexane	3,0	2,4
1.4-диоксан 1,4-dioxane	1,3	1,9
Толуол Toluene	3,6	0,8
Хлорбензол Chlorobenzene	3,3	0,7
Этилбензол Ethylbenzene	3,4	0,9
м-ксилол/*п*-ксилол *m*-xylene/*p*-xylene	3,3	0,9
о-ксилол *o*-xylene	3,1	0,8
Среднее СКО% Average standard deviation %	2,7	1,3
Класс 2В **Class 2B**	**Растворитель: вода** **Solvent: water**	**Растворитель: ДМСО** **Solvent: DMSO**
Гексан Hexane	1,2	0,8
Нитрометан Nitromethane	2,9	1,5
Хлороформ Chloroform	0,9	1,0
1,2-диметоксиэтан 1,2-dimethoxyethane	1,4	0,9
Трихлорэтен Trichlorethene	1,9	0,7
Пиридин Pyridine	0,8	1,4
2-гексанон 2-hexanone	0,6	0,4
Тетралин Tetralin	0,9	0,6
Среднее СКО% Average standard deviation %	1,3	0,9

Линейность системы

Линейность системы оценивали путем последовательного разбавления исходных растворов для остаточных растворителей класса 1, класса 2А и класса 2В, как описано в методе USP <467> (процедура С для нерастворимых в воде фармацевтических продуктов). Таким образом, были получены четыре уровня калибровки: 12,5; 25; 50 и 100 % от предела концентрации. Перед анализом 1 мл каждого калибровочного раствора добавляли к 5 мл воды, что соответствует 50 мг реального образца. Каждый уровень калибровки был подготовлен и проанализирован в трех экземплярах. Остаточные растворители показали хорошие линейные отклики со средним коэффициентом детерминации $R^2 = 0{,}998$, как показано в таблице 5. Кроме того, относительное стандартное отклонение (%RSD) остатков на каждом уровне калибровки было <8 %, что указывает на хорошую линейность.

Примеры калибровочных кривых для бензола (класс 1), метилциклогексана (класс 2А) и трихлорэтилена (класс 2В) показаны на рисунке 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, представленные в этой работе, демонстрируют, что новый автоматический пробоотборник TriPlus 500 HS в сочетании с Trace 1310 GC и детектором ПИД обеспечивает необходимую производительность для анализа остаточных растворителей в фармацевтических продуктах и соответствует всем требования метода USP <467> или даже превосходит их.

- Инновационная конструкция пневматического управления и инертность пути потока обеспечивают исключительную воспроизводимость и точность рутинных анализов. Это было продемонстрировано полученным отличным воспроизведением площади пика (средние значения %RSD площади пика для n = 18 последовательных инъекций были <3 %).
- Чувствительное обнаружение соединений может быть легко достигнуто с помощью детектора Instant Connect FID. Более того, колонка TraceGOLD

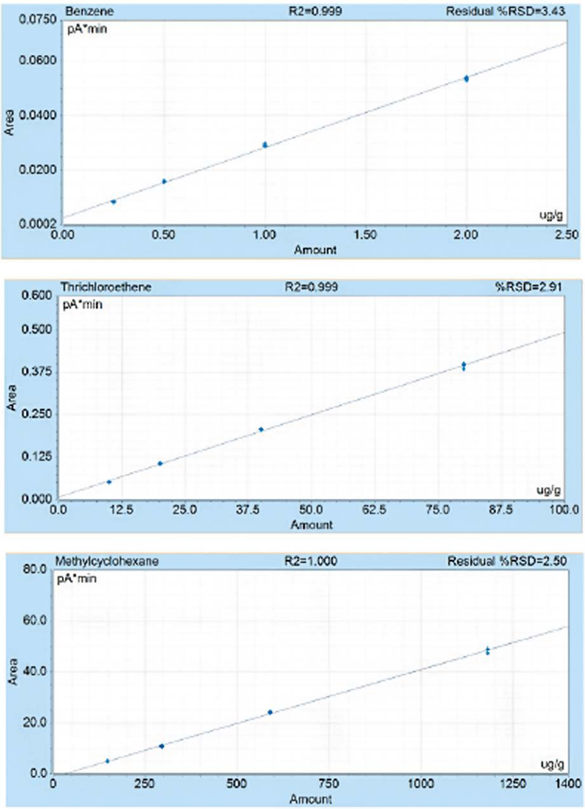


Рисунок 9. **Примеры калибровочных кривых для бензола, метилциклогексана и трихлорэтена. Линейность показана от 0,01 до 0,1 мкг/мл (соответствует 0,25–2,0 мкг/г в 50 мг фармацевтического продукта) для бензола от 7,4 до 59 мкг/мл, что соответствует 147–1180 мкг/г) для метилциклогексана от 0,5 до 4,0 мкг/мл (соответствует 10–80 мкг/г) для трихолоэтена. Для каждого уровня калибровки *n* = 3 повтора**

Figure 9. **Examples of calibration curves for benzene, methylcyclohexane and trichlorethylene. Linearity is shown from 0.01 to 0.1 µg/ml (corresponding to 0.25–2.0 µg/g in a 50 mg pharmaceutical product) for benzene from 7.4 to 59 µg/ml, which corresponds to 147–1180 µg/d) for methylcyclohexane, from 0.5 to 4.0 µg/ml (corresponding to 10–80 µg/g) for tricoloethene. For each calibration level *n* = 3 repetitions**

TG-624 позволила легко удовлетворить и превзойти требования к разрешающей способности метода USP <467> (Rs ≥ 1,0), обеспечивая ожидаемые характеристики хроматографического разделения.

- Хорошая линейность (продемонстрированная остаточными значениями R2 и %RSD) была получена в диапазоне калибровки, что гарантирует возможность использования системы для рутинной количественной оценки остаточных растворителей в фармацевтических продуктах.
- Программное обеспечение Chromeleon CDS (соответствует требованиям Title 21 CFR Part 11) обеспечивает целостность и отслеживаемость данных, эффективное управление данными от контроля прибора до окончательного отчета.

В целом эти результаты демонстрируют, что автоматический пробоотборник TriPlus 500 HS обеспечивает беспрецедентный уровень производительности, что делает его стабильным и надежным аналитическим решением для рутинных лабораторий.

Таблица 5. **Коэффициенты корреляции (R2) и относительное стандартное отклонение остатков (%RSD), полученные по четырем уровням калибровки при 12,5; 25; 50 и 100 %. Данные проанализированы в трех повторностях**

Table 5. **Correlation coefficients (R2) and relative standard deviation of residuals (%RSD) obtained at four calibration levels at 12.5, 25, 50 and 100 %. Data analyzed in triplicate**

Наименование вещества Name of substance	**Интервал концентраций (мкг/г)** Concentration range (µg/g)	**Коэффициент корреляции (R^2)** Correlation coefficient (R^2)	**Стандартное отклонение (%RSD)** Standard deviation (%RSD)
Класс 1 Class 1			
1,1-трихлорэтен 1,1-trichlorethene	1,0–8,0	1,000	2,0
1,1,1-трихлорэтан 1,1,1-trichloroethane	187,5–1500	0,999	2,9
Четыреххлористый углерод Tetrachloride carbon	0,5–4,0	0,997	6,9
Бензол Benzene	0,3–2,0	0,999	3,4
1,2-дихлорэтан 1,2-dichloroethane	0,6–5,0	0,999	2,4
Класс 2A Class 2A			
Метанол Methanol	375–3000	1,000	1,4
Ацетонитрил Acetonitrile	51,3–410	1,000	1,7
Дихлорметан Dichloromethane	75–600	0,998	4,2
Транс-1,2-дихлорэтен *Trans*-1,2-dichloroethene	233,8–935	0,999	2,0
Цис-1,2-дихлорэтен *Cis*-1,2-dichloroethene	233,8–935	0,998	2,9
Тетрагидрофуран Tetrahydrofuran	90–720	1,000	5,0
Циклогексан Cyclohexane	422,5–3380	0,999	2,2
Метилциклогексан Methylcyclohexane	147,5–1180	1,000	2,2
1,4-диоксан 1,4-dioxane	47,5–380	1,000	3,0
Толуол Toluene	111,3–890	0,997	2,5
Хлорбензол Chlorobenzene	45–360	0,995	1,5
Этилбензол Ethylbenzene	46,1–369	0,996	5,6
м-Ксилол *m*-Xylene	162,8–1302	0,997	6,5
п-Ксилол *p*-Xylene	162,8–1302	0,996	6,0
о-Ксилол *o*-Xylene	24,4–195	0,997	5,6
Класс 2B Class 2B			
Гексан Hexane	36,3–290	0,998	9,0
Нитрометан Nitromethane	6,3–50	0,998	6,1
Хлороформ Chloroform	7,5–60	0,997	0,9
Трихлорэтен Trichlorethene	10–80	0,999	2,1
2-гексанон 2-hexanone	6,3–50	0,992	4,4
Тетралин Tetralin	12,5–100	0,999	3,0

Рекламная статья / Sponsored article

В фокусе – безопасность пациентов

Тенденции на рынке сверхчистой упаковки для фармацевтической продукции

Статья предоставлена компанией «ХИММЕД»

На сегодня фокус на безопасности пациента и удовлетворении его индивидуальных потребностей является новым веянием, следствием чего являются новые требования, предъявляемые к лекарственным препаратам и средствам их доставки. Уже давно совершенно очевидно, что растущие требования, предъявляемые к чистоте, могут быть удовлетворены только при использовании сверхчистой упаковки во всей цепочке поставок. Как вторичная, так и первичная упаковка должна быть произведена в условиях «чистых помещений», чтобы соответствовать всем существующим стандартам.

Focus on Patient Safety

Trends in the Ultrapure Packaging Market for Pharmaceutical Products

The article is presented by the company "HIMMED"

Focusing on patient safety and meeting his individual needs is a new trend, resulting in new requirements for drugs and their delivery vehicles. It is obvious that the growing demands on cleanliness can only be met with using ultra-clean packaging throughout the supply chain. Both secondary and primary packaging must be produced in a "clean room" environment to meet all existing standards.

В фармацевтической промышленности спрос на сверхчистую упаковку остается высоким. Уже давно совершенно очевидно, что растущие требования, предъявляемые к чистоте, могут быть удовлетворены только при использовании сверхчистой упаковки во всей цепочке поставок. Как вторичная, так и первичная упаковка должна быть произведена в условиях «чистых помещений», чтобы соответствовать всем существующим стандартам. К этому следует добавить ужесточение нормативных требований, например, ограничения по видам используемого сырья и требования к предоставлению фармкомпаниями дополнительной документации в отношении упаковки, полученной от ее производителей.

На сегодня фокус на безопасности пациента и удовлетворении его индивидуальных потребностей является новым веянием. До настоящего времени нормативы Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA) касались защиты фармацевтической продукции. При этом акцент делался на усовершенствовании средств доставки лекарств и оказании услуг пациенту. Сегодня же основное внимание уделяется только пациенту, следствием чего являются новые требования, предъявляемые к лекарственным препаратам и средствам их доставки.

Фармацевтическая продукция должна быть диверсифицирована гораздо шире. Лекарственные препараты и их дозировки для детей и подростков отличаются от таковых для взрослых.

Малые размеры серии необходимы для того, чтобы соответствовать специфическим требованиям. Для производства это означает наращивание модульных производственных мощностей и ужесточение требований к «изолированию». Данная тенденция еще более усиливается в связи с существующими различиями между группами пациентов по половому признаку и происхождению (развитые страны, развивающиеся страны и развивающиеся рынки). Эти важные факторы необходимо учитывать при выборе препарата для пациента.

Такое развитие ситуации обусловливает появление новых тенденций в производстве упаковки, при выпуске которой как части продукта следует учитывать потребности пациента и характеристики препарата. Поэтому в целях максимального удовлетворения всех требований необходимо наладить активную связь между фармацевтической компанией и поставщиком.

Основные требования формулируются в соответствии со стандартами сертификации, которую должен пройти производитель упаковки, чтобы получить доступ к производству упаковочных матери-

алов. Сертификация по ISO 9001 – это абсолютный стандарт, соблюдение которого должно быть строго обязательным при любых обстоятельствах. ISO 15378 – это стандарт, основанный на ISO 9001 и дополнительно включающий в себя требования GMP для производителей упаковки. Следует отметить, что большинство компаний Big Pharma требует соответствия данному стандарту.

Класс чистоты «чистого помещения», который определен в стандарте ISO 14644-1, также важен для упаковки, поскольку каждая частица загрязнения классифицируется как критический признак. Все компоненты должны быть произведены в тех же или даже в лучших условиях, чем конечный продукт, чтобы избежать попадания дополнительного загрязнения из упаковки. Проведение дополнительного тестирования на загрязнение частицами непосредственно для упаковки необходимо с целью проверки ее пригодности для соответствующего продукта. Защитную упаковку необходимо дополнительно проанализировать и произвести в тех же условиях, что и основную. Только таким образом материал будет защищен от дополнительного загрязнения и беспроблемно передан в «чистое помещение» клиента. В дополнение к сертификации, которую должен получить производитель упаковки, существует также ряд международных требований и стандартов. Для европейского рынка очень важны требования Европейской Фармакопеи. Соответственно, если конечный продукт поставляется на американский рынок, то необходимо учесть все требования Американской Фармакопеи. В обоих случаях должны быть проверены сырье и упаковка, которые используются, и подтверждена их пригодность. Интенсивное сотрудничество между производителем упаковочных материалов и изготовителем гранул является важным для проведения соответствующих тестов и решения возникающих проблем. Выбор правильных типов гранул или добавок, таких как, например, антиблок, чрезвычайно важен, поскольку очень немногие добавки соответствуют международным Фармакопеям и поэтому подходят для упаковки.

Один важный аспект гарантирует поставки продукции на рынок. Не последнюю роль в этом играет тема контроля изменений. Например, между производителями фармацевтической продукции и производителем упаковки должны быть зарегистрированы в качестве дополнительных соглашений соответствующие пункты, которые касаются признаков возможных изменений. Производитель упаковочных материалов всегда должен быть готов к проведению аудита, чтобы продемонстрировать представителям фармацевтической компании понимание ее внутренних рабочих процессов, предоставить любую интересующую их документацию, а также проверить качество продукции. Это дополнительно поддерживает оптимизацию процессов и обеспечивает безопасность упаковки. Также важна внутренняя и внешняя проверка, данные которой будут гарантировать соответствующую квалификацию сотрудников и направлены на улучшение функционирования всей системы поставок.

Эксперты отдела продаж, производства и контроля качества компании B+K, находясь в тесном взаимодействии друг с другом, оказывают интегрированную поддержку своим клиентам из фармацевтических компаний, предлагая им соответствующие решения с учетом всех аспектов и требований. Кроме того, у компании B+K очень развита сеть глобальных офисов продаж по всему миру, которая обеспечивает оптимизацию клиентской поддержки. Широкий ассортимент упаковочной продукции CleanFlex® позволяет компании на протяжении многих лет оставаться ведущим европейским поставщиком упаковки для фармацевтической продукции. B+K обеспечивает поставку всего ассортимента первичной упаковки – от плоских полиэтиленовых пакетов для активных фармацевтических веществ и пакетов для стерилизации вспомогательных изделий и компонентов, таких как резиновые пробки или медицинские инструменты, до сложных систем, используемых для продукта в качестве проводников и изоляторов.

Информационная статья / Informational article

С 31 марта по 1 апреля прошла первая фармацевтическая выставка-форум «ТехноФарм Сибирь»

«ТехноФарм Сибирь» – первое подобное мероприятие в Сибирском регионе. На одной площадке организаторам удалось собрать как производителей оборудования для фармацевтической промышленности, так и компании, оказывающие услуги в сфере контрактного производства и строительства «чистых помещений». Также в рамках мероприятия посетителям представилась уникальная возможность лично пообщаться с заместителем министра промышленности, торговли и развития предпринимательства Новосибирской области.

The First Pharmaceutical Exhibition-forum was Held from March 31st to April 1st

TechnoPharm Siberia is the first such event in the Siberian region. On one site, the organizers managed to gather both manufacturers of equipment for the pharmaceutical industry and companies providing services in the field of contract manufacturing and construction of clean rooms. Also, within the framework of the event, visitors had a unique opportunity to personally communicate with the Deputy Minister of Industry, Trade and Entrepreneurship Development of the Novosibirsk Region.

Мероприятие «ТехноФарм Сибирь» состоялось на самой масштабной площадке города «Экспоцентр Новосибирск».

«ТехноФарм Сибирь» – это первое в регионе мероприятие, которое объединило как компании, занимающиеся продажей оборудования для производства фармацевтических препаратов, упаковочных материалов и сырья, так и компании, оказывающие услуги контрактного производства и обустройства «чистых помещений».

Наряду с выставкой проходила деловая часть мероприятия, где освещались актуальные вопросы в области фармацевтики. Деловая программа проходила в комфортной обстановке, где посетителям представилась возможность не только послушать спикеров, но и задать все интересующие вопросы в режиме диалога.

Для многих региональных компаний площадка «ТехноФарм Сибирь» – это возможность заявить о себе, а для крупных игроков фармацевтического рынка – освоить новые направления развития и укрепить свои позиции в таком быстроразвивающемся регионе, как Сибирский и Дальневосточный федеральные округ.

В рамках мероприятия «ТехноФарм Сибирь» участникам и посетителям представился уникальный случай: более 4 часов общения с заместителем министра промышленности, торговли и развития предпринимательства Новосибирской области **Васильевым Вадимом Витальевичем**.

«ТехноФарм Сибирь 2021» в цифрах:

Участниками выставки стали: 35 компаний.

Посетили форум-выставку: 758 человек.

Количество актуальных тем, представленных на форуме: 18 докладов.

«Уверенны, что мы задали правильный вектор и в 2022 году после снятия всех ограничений, связанных с пандемией, к нам смогут присоединиться компании международного уровня.

Ждем Вас в 2022 году на площадке «ТехноФарм Сибирь».

Организатор ООО «ТехноФарм» https://www.techno-farm.com/

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-25-31
УДК 547.732.7; 544.165

Оригинальная статья / Research article

Целенаправленный синтез и анализ биологически активных азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида

А. С. Чиряпкин*, И. П. Кодониди, М. В. Ларский

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

***Контактное лицо:** Чиряпкин Алексей Сергеевич. **E-mail:** alexey.chiriapkin@yandex.ru

ORCID: А. С. Чиряпкин – https://orcid.org/0000-0001-8207-2953; И. П. Кодониди – https://orcid.org/0000-0003-1333-3472; М. В. Ларский– https://orcid.org/0000-0002-4406-7165.

Статья поступила: 11.02.2021 **Статья принята в печать:** 20.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Азометиновые производные 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида являются ациклическими предшественниками биологически активных соединений (БАС) производных 5,6,7,8-тетрагидро-3Н-бензотеофено[2,3-d]пиримидин-4-она. В литературе приведены примеры этих групп соединений, обладающих различными фармакологическими свойствами, однако главным образом описано их цитостатическое действие. Эти данные и препаративная доступность позволяют судить о перспективности дальнейшего изучения и молекулярного конструирования в ряду азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида. Оптимизация методов синтеза и анализа веществ данного ряда, а также выявление закономерностей «структура-активность» представляют значительный интерес для медицинской химии и фармацевтической науки. Полученные соединения-лидеры позволят в дальнейшем разработать лабораторный регламент синтеза активной фармацевтической субстанции.

Цель. Осуществить прогноз и оптимизировать методику синтеза и анализа высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) фармакологически активных азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида.

Материалы и методы. Прогноз биологической активности осуществлялся посредством веб-ресурса PASS Online. Синтез целевых азометинов проводился взаимодействием ароматических альдегидов с 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамидом в среде этанола. Контроль прохождения реакции проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Определение родственных примесей осуществлялось методом ВЭЖХ. Анализ проводился в условиях изократического элюирования подвижной фазой ацетонитрил – вода (70:30).

Результаты и обсуждение. Прогноз биологической активности позволил предположить проявление цитостатической, противотуберкулезной и противовоспалительной активности у целевых азометинов. Анализ реакционной способности выявил влияние заместителей, содержащихся в ароматическом ядре альдегидов, на полноту прохождения реакции конденсации. Спектральные характеристики однозначно подтвердили строение продуктов, а результаты ВЭЖХ показали чистоту полученных веществ, которая составляет более 96 %.

Заключение. В результате проведенных исследований было обосновано строение перспективных азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида, оптимизирована их методика синтеза и анализа посредством ВЭЖХ. Результаты исследований позволят в дальнейшем выявить соединения-лидеры с заданными фармакологическими свойствами и использовать полученные закономерности «структура-активность» в дальнейшем молекулярном конструировании БАС.

Ключевые слова: азометины, 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамид, молекулярное конструирование, PASS, синтез азометинов, реакция присоединения – отщепления, ВЭЖХ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. С. Чиряпкин произвел синтез, установление структуры и количественный анализ методом ВЭЖХ. И. П. Кодониди создал дизайн исследования, осуществил установление структуры полученных соединений и анализ реакционной способности исходных соединений. М. В Ларский произвел изучение чистоты продуктов ВЭЖХ и интерпретацию полученных данных. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании статьи.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90060.

Для цитирования: Чиряпкин А. С., Кодониди И. П., Ларский М. В. Целенаправленный синтез и анализ биологически активных азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):25–31. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-25-31

Targeted Synthesis and Analysis of Biologically Active Azomethine Derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide

Alexey S. Chiriapkin*, Ivan P. Kodonidi, Mikhail V. Larsky

Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinina av., Pyatigorsk-32, 357532, Russia

***Corresponding author:** Alexey S. Chiriapkin. **E-mail:** alexey.chiriapkin@yandex.ru

ORCID: Alexey S. Chiriapkin – https://orcid.org/0000-0001-8207-2953; Ivan P. Kodonidi – https://orcid.org/0000-0003-1333-3472; Mikhail V. Larsky– https://orcid.org/0000-0002-4406-7165.

Received: 11.02.2021 **Revised:** 20.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Azomethine derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide are acyclic precursors of biologically active compounds derived from 5,6,7,8-tetrahydro-3H-benzoteopheno[2,3-d]pyrimidine-4-one. Examples of these groups of compounds with different pharmacological properties are given in the literature, but their cytostatic effect is mainly described. These data and the preparative availability allow us to judge the prospects for further study and molecular design in a number of azomethine derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide. Optimization of methods for the synthesis and analysis of substances of this series and the identification of structure-activity relationship are of considerable interest for medical chemistry and pharmaceutical science. The resulting leading compounds will allow us to further develop laboratory requirements for the synthesis of an active pharmaceutical substance.

Aim. To make a predict, optimize the synthesis conditions and develop a method for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmacologically active azomethine derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide.

Materials and methods. The prediction of biological activity was carried out through the web resource PASS Online. The synthesis of the target azomethines was carried out by the interaction of aromatic aldehydes with 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide in an ethanol. The reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC). The determination of related impurities was done by HPLC. The analysis was carried out under the conditions of isocratic elution with a mobile phase of acetonitrile – water (70:30).

Results and discussion. The results of the prediction of the biological activity of the constructed structures suggest the manifestation of cytostatic, antitubercular and anti-inflammatory activity characteristic of all target azomethines. The analysis of the reactivity revealed the influence of substituents of aldehydes contained in the aromatic core on the completeness of the condensation reaction. The spectral characteristics clearly confirmed the structure of the products, and the HPLC results showed the purity of the obtained substances, which is more than 95 %.

Conclusion. As a result of the conducted studies, the structure of promising azomethine derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide was justified and the method of their synthesis and analysis by HPLC was optimized. In the future, the results of the research will allow us to identify the leading compounds with the specified pharmacological properties.

Keywords: azomethines, 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide, molecular design, PASS, synthesis of azomethines, addition – elimination reaction, HPLC

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Alexey S. Chiriapkin performed synthesis, structural determination and quantitative analysis by HPLC method. Ivan P. Kodonidi creaded research design, determination of the structure of the obtained compounds and analysis of the reactivity of the initial compounds. Mikhail V. Larsky studied of the purity of products by HPLC method and interpretation of the obtained results. All the authors participated in the discussion of the results and the writing of the article.

Acknowledgment. The reported study was funded by RFBR, project number 20-315-90060.

For citation: Chiriapkin A. S., Kodonidi I. P., Larsky M. V. Targeted synthesis and analysis of biologically active azomethine derivatives of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):25–31. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-25-31

ВВЕДЕНИЕ

Азометины – это класс органических соединений, которые получаются в результате конденсации альдегидов с первичными ароматическими аминами. Особый интерес представляют азометины 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида в связи с их высокой биологической активностью. В настоящее время известны методики конденсации 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида с ароматическими альдегидами, приводящие к образованию соответствующих азометинов. Например, украинский коллектив ученых получал их путем взаимодействия 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида с соответствующими альдегидами в среде кипящего толуола. Эти структуры можно рассматривать как ациклические предшественники пиримидин-4-она. Дальнейшая их циклизация приводит к получению 2-замешенных производных 5,6,7,8-тетрагидро-3Н-бензотиофено[2,3-d]пиримидин-4-она [1]. Производные этих групп соединений обладают цитостатической активностью [2], подавляют рост опухолевых клеток [3], проявляют противовоспалительную активность [4]. Исследования производных тиофенопиримидина с различными сопряженными циклическими системами показали, что модификация 6,7,8-тетрагидро-3Н-бензотиофено[2,3-d]пиримидин-4-она путем замены сопряженного циклогексана на 1-метилпиперидин приводит к увеличению противоонкологических свойств у соединений в отношении рака молочной железы [5]. Установлено, что азометиновые производные 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида ингибируют протеинкиназу G из *Mycobacterium tuberculosis* [6] и фактор роста фибробластов [7]. У азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида, полученных с использованием триэтилортоформиата и 4-хлорбензальдегида, выявлены антибактериальные свойства в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtillis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* [8]. Стоит отметить, что азометиновые производные 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида зачастую не выделяют как промежуточные продукты реакции получения их тиофенопиримидинов [2, 5, 9], а данные соединения могут оказаться не менее биологически активными соединениями (БАС).

Таким образом, оптимизация методов синтеза уже полученных соединений, а также синтез новых представителей данного ряда, разработка методов их анализа и выявление закономерностей «структура-активность» представляют значительный интерес для медицинской химии и фармацевтической науки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Прогноз. Структурные формулы моделируемых соединений были построены в программе BIOVIA Draw 17.2. Компьютерный прогноз биологической активности моделируемых соединений осуществлен посредством веб-ресурса PASS Online [10]. Результат был представлен в виде величины вероятности Pa «быть активным» для различных видов биологического действия у моделируемых соединений, максимальное возможное значение которого 100 %. Далее осуществлялся анализ полученных данных спектра биологической активности азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида с целью выбора наиболее вероятных видов биологического действия.

Анализ. Температуру плавления веществ ($T_{пл.}$) измеряли на приборе ПТП (М). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили с использованием пластин Sorbfil для тонкослойной хроматографии. Ультрафиолетовые спектры (УФ-спектры) измеряли на приборе СФ-2000, а инфракрасные спектры (ИК-спектры) на ИК Фурье-спектрометре ФСМ 1201 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Протонные спектры ядерного магнитного резонанса (^{1}Н ЯМР-спектры) фиксировали на приборе Bruker Avance III 400 МГЦ (Bruker, Германия). Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на хроматографе «Стайер» (АО «Аквилон», Россия), снабженном УФ-детектором UVV-104M (АО «Аквилон», Россия).

Условия определения посторонних примесей в анализируемых образцах с помощью ВЭЖХ: хроматографическая колонка Luna C18 150 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза: смесь ацетонитрила и воды для ВЭЖХ в объемном соотношении компонентов 70:30, продолжительность анализа 30 минут, температура колонки 25 °С, объем пробы 20 мкл, длина волны детектирования 210 нм. В указанных условиях проводили хроматографирование синтезированных и исходных веществ, а также подвижной фазы.

Приготовление испытуемых растворов. 0,01 г субстанции (точная навеска) растворяли в подвижной фазе, используя мерную колбу вместимостью 50 мл. Переносили 5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл, после чего объем раствора доводили до метки подвижной фазой. Полученный раствор фильтровали через нейлонный мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм, после чего проводили анализ.

Синтез. Общая методика синтеза азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида. Смесь из 0,01 моля (1,92 г) соединения **1** и эквимолярного количества соответствующего альдегида (2) (в случае соединения **3e** 0,012 моля) растворяли при слабом кипячении в 30 мл 96%-го этилового спирта. Реакцию проводили при перемешивании в течение 30–60 минут. Целевой продукт реакции с ванилином дополнительно осаждали водой. При охлаждении реакционной среды образуется осадок, который отфильтровывали и очищали перекристаллизацией из этанола.

2-[бензилиденамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3a).

Продукт реакции представляет собой желтое мелкокристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 93 %. R_f = 0,879 [БУВ (бутанол-1 : уксусная кислота : вода) – 4:1:5]. $T_{пл.}$ = 195–198 °С (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), λ_{max}: 205, 240, 289, 387 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3372 (NH), 3168 (NH), 1636 (C=O), 1616 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.85–1.66 (м, 4H, CH_2); 2.72 (к, *J* = 7.4 Гц, 4H, CH_2); 7.45 (с, 1H, ArH); 7.59–7.50 (м, 3H, ArH); 7.92 (дт, *J* = 7.7, 2.5 Гц, 2H, NH, ArH); 8.03 (с, 1H, NH); 8.54 (д, *J* = 2.4 Гц, 1H, N=CH).

2-[(2-гидроксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3b).

Продукт реакции представляет собой желтое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 79 %. R_f = 0,865 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 215–219 °С (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), λ_{max}: 210, 241, 286, 384 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3283 (NH), 3186 (NH), 1647 (C=O), 1617 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, м.д.: 1.75 (дд, *J* = 19.7, 11.5 Гц, 4H, CH_2); 2.66 (дт, *J* = 37.7, 5.8 Гц, 4H, CH_2); 6.95 (т, *J* = 7.8 Гц, 2H, ArH); 7.46–7.34 (м, 1H, ArH); 7.53 (с, 1H, ArH); 7.69 (дд, *J* = 7.7, 1.8 Гц, 1H, NH); 7.90 (с, 1H, NH); 8.66 (д, *J* = 2.4 Гц, 1H, N=CH); 11.81 (д, *J* = 2.5 Гц, 1H, OH).

2-[(4-гидроксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3c).

Продукт реакции представляет собой светло-коричневое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 74 %. R_f = 0,851 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 229–233 °С (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), λ_{max}: 206, 242, 306, 393 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3407 (NH), 3283 (NH), 1647 (C=O), 1597 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.85–1.62 (м, 4H, CH_2); 2.71 (дт, *J* = 32.6, 6.4 Гц, 4H, CH_2); 7.00–6.81 (м, 2H, ArH); 7.36 (с, 1H, ArH); 7.76–7.78 (д, *J* = 8.2 Гц, 2H, NH, ArH); 8.18 (с, 1H, NH); 8.41 (с, 1H, N=CH); 10.36 (с, 1H, OH).

2-[(4-гидрокси-3-метоксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3d).

Продукт реакции представляет собой желтое аморфное вещество без запаха. Выход продукта 80 %. R_f = 0,853 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 223–225 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 204, 251, 302, 392 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3530 (OH), 3372 (NH), 3171 (NH), 1628 (C=O), 1582 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.74 (дт, *J* = 24.1, 7.2 Гц, 4H, CH_2); 2.71 (дт, *J* = 30.4, 6.3 Гц, 4H, CH_2); 3.85 (д, *J* = 3.2 Гц, 3H, CH_3); 6.92 (дд, *J* = 8.2, 3.2 Гц, 1H, ArH); 7.46–7.33 (м, 2H, ArH); 7.48 (д, *J* = 1.8 Гц, 1H, NH); 8.29–8.04 (м, 1H, NH); 8.40 (д, *J* = 2.9 Гц, 1H, N=CH); 10.00 (с, 1H, OH).

2-[(3-гидрокси-4-метоксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3e).

Продукт реакции представляет собой желтое аморфное вещество без запаха. Выход продукта 79 %. R_f = 0,818 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 201–204 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 204, 252, 301, 394 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3461 (OH), 3291 (NH), 3133 (NH), 1651 (C=O), 1597 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.81–1.67 (дт, *J* = 24.1, 7.2 Гц, 4H, CH_2); 2.72 (дт, *J* = 28.7, 6.3 Гц, 4H, CH_2); 3.86 (д, *J* = 2.4 Гц, 3H, CH_3); 6.89 (д, *J* = 30.4, 1H, ArH); 6.92 (дд, *J* = 8.2, 3,2 Гц, 1H, ArH); 7.47–7.31 (м, 2H, NH, ArH); 8.14 (с, 1H, NH); 8.37 (д, *J* = 2.3 Гц, 1H, N=CH); 9.49 (с, 1H, OH).

2-[(2-гидрокси-3-метоксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3f).

Продукт реакции представляет собой желтое аморфное вещество без запаха. Выход продукта 77 %. R_f = 0,838 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 238–241 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 205, 220, 293, 387 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3457 (OH), 3345 (NH), 3171 (NH), 16671 (C=O), 1605 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.92–1.59 (м, 4H, CH_2); 2.66 (дт, *J* = 37.1, 5.9 Гц, 4H, CH_2); 3.83 (с, 3H, CH_3); 6.90 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H, CH); 7.12 (д, *J* = 7.9 Гц, 1H, CH); 7.28 (д, *J* = 7.8 Гц, 1H, CH); 7.52 (с, 1H, NH); 7.87 (с, 1H, NH); 8.66 (с, 1H, N=CH); 11.68 (с, 1H, OH).

2-[(2,4-дигидроксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3g).

Продукт реакции представляет собой желтое аморфное вещество без запаха. Выход продукта 71 %. R_f = 0,831 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 207–211 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 205, 257, 297, 392 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3399 (OH), 3360 (NH), 3164 (NH), 1640 (C=O), 1597 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.89–1.55 (м, 4H, CH_2); 2.64 (дт, *J* = 29.1, 5.9 Гц, 4H, CH_2); 6.31 (д, *J* = 2.3 Гц, 1H, ArH); 6.39 (дд, *J* = 8.6, 2.2 Гц, 1H, ArH); 7.43 (с, 1H, ArH); 7.50 (д, *J* = 8.5 Гц, 1H, NH); 7.87 (с, 1H, NH); 8.51 (с, 1H, N=CH); 10.31 (с, 1H, OH); 11.98 (с, 1H, OH).

2-[*n*-толилиметиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3h).

Продукт реакции представляет собой желтое аморфное вещество без запаха. Выход продукта 95 %. R_f = 0,853 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 197–199 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 205, 242, 294, 383 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3384 (NH), 3183 (NH), 1636 (C=O), 1586 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.74 (дд, *J* = 24.1, 7.5 Гц, 4H, CH_2); 2.39 (д, *J* = 2.4 Гц, 3H, CH_3); 2.71 (дт, *J* = 14.1, 6.0 Гц, 4H, CH_2); 7.48–7.31 (м, 3H, ArH); 7.81 (дд, *J* = 8.4, 2.3 Гц, 2H, NH, ArH); 8.07 (с, 1H, NH); 8.50 (д, *J* = 2.4 Гц, 1H, N=CH).

2-[(4-метоксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3i).

Продукт реакции представляет собой желтое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 77 %. R_f = 0,895 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 186–190 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 205, 243, 294, 383 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3372 (NH), 3183 (NH), 1640 (C=O), 1586 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.86–1.63 (м, 4H, CH_2); 2.71 (дт, *J* = 29.8, 6.3 Гц, 4H, CH_2); 3.85 (д, *J* = 1.3 Гц, 3H, CH_3); 7.15–7.03 (м, 2H, ArH); 7.39 (с, 1H, ArH); 7.94–7.79 (м, 2H, NH, ArH); 8.20–8.09 (м, 1H, NH); 8.45 (с, 1H, N=CH).

2-[(5-третбутил-2-гидроксифенил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3k).

Продукт реакции представляет собой желтое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 79 %. R_f = 0,883 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 176–180 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 213, 243, 289, 390 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3411 (OH), 3291 (NH), 3164 (NH), 1667 (C=O), 1605 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.29 (с, 9H, CH_3); 1.83–1.69 (м, 4H, CH_2); 2.65 (дд, *J* = 38.9, 6.2 Гц, 4H, CH_2); 6.88 (д, *J* = 8.6 Гц, 1H, ArH); 7.44 (дд, *J* = 8.6, 2.5 Гц, 1H, ArH); 7.54 (с, 1H, ArH); 7.70 (д, *J* = 2.5 Гц, 1H, NH); 7.88 (с, 1H, NH); 8.67 (с, 1H, N=CH); 11.66 (с, 1H, OH).

2-[(2-фурил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3l).

Продукт реакции представляет собой коричневое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 93 %. R_f = 0,868 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 187–191 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), $λ_{max}$: 205, 245, 307, 397 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3399 (NH), 3191 (NH), 1644 (C=O), 1613 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.85–1.65 (м, 4H, CH_2); 2.72 (дт, *J* = 31.2, 6.2 Гц, 4H, CH_2); 6.84–6.71 (м, 1H, ArH); 7.29 (дд, *J* = 7.0, 3.2 Гц, 1H, ArH); 7.41 (с, 1H, ArH); 8.12–7.99 (м, 1H, NH); 8.31 (д, *J* = 16.3 Гц, 2H, N=CH, NH).

2-[(5-метил-2-фурил)метиленамино]-4,5,6,7-тетрагидробензотиофен-3-карбоксамид (3m).

Продукт реакции представляет собой желтое кристаллическое вещество без запаха. Выход продукта 88 %. R_f = 0,868 (БУВ – 4:1:5). $T_{пл.}$ = 175–177 °C (перекристаллизация из этанола). УФ-спектр (этанол), λ_{max}: 205, 243, 313, 398 нм. ИК-спектр (вазелиновое масло): 3364 (NH), 3175 (NH), 1647 (C=O), 1613 (C=N) см$^{-1}$. Спектр ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6), δ, м.д.: 1.82–1.64 (м, 4H, CH_2); 2.41 (с, 3H, CH_3); 2.71 (дт, *J* = 36.5, 6.2 Гц, 4H, CH_2); 6.42 (д, *J* = 3.4 Гц, 1H, ArH); 7.20 (д, *J* = 3.5 Гц, 1H, ArH); 7.38 (с, 1H, NH); 8.26 (д, *J* = 39.1 Гц, 2H, N=CH, NH).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам прогноза биологической активности (таблица 1) все соединения характеризуются ингибирующей активностью тиол-протеазы. Известно, что цистеиновые протеазы вовлекаются в широкий ряд патологических процессов. Основными процессами являются сердечно-сосудистые заболевания, воспалительные процессы, вирусные заболевания и нарушения иммунологических процессов [11]. Практически все прогнозируемые азометиновые производные 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида могут обладать выраженной противотуберкулезной активностью. Ингибирование фермента гистоновой деацетилазы SIRT1 III класса в раковых клетках показало выраженный противоопухолевый эффект на моделях рака у животных [12], соответственно можно ожидать цитостатические свойства исследуемых веществ, кроме фурил производных. Метаболические процессы организма можно регулировать путем влияния на усиление экспрессии гена HMGCS2. Прогнозируемое влияние соединений на синтез белка Mcl-1 может оказывать противоопухолевое действие и использоваться для лечения миелолейкоза [13]. Вероятность проявления противовоспалительных свойств у моделируемых соединений значительно меньшая в отличие от предыдущих видов биологической активности, а производные азометинов, содержащие 2-гидрокси-3-метоксифенильный и фуриловые фрагменты, предположительно мало активны.

Синтез амидов протекает по классическому механизму нуклеофильного присоединения – отщепления, поэтому первая стадия подразумевает нуклеофильную атаку частично положительного атома углерода карбонильной группы. Дальнейшая стабилизация аддукта протекает отщеплением воды. Соответственно на прохождение первой стадии реакции должен влиять зарядовый контроль, т. е. величина частично положительного заряда на углероде альдегидной группы. В свою очередь, на его величину влияют заместитель ароматического ядра бензальдегидов. Снижение электронной плотности электронодонорными заместителями на атоме углерода альдегидной группы приводит к дезактивированию нуклеофильной атаки и, как следствие, уменьшению выходов целевого продукта.

Исходя из этого можно объяснить заниженные выходы в реакциях с участием бензальдегидов, содержащих ярко выраженные электронодонорные заместители, особенно в орто- и пара-положениях (рисунок 1, таблица 2).

Таблица 1. Результаты прогноза биологической активности веб-ресурса PASS Online

Table 1. Results of predict of the biological activity by the PASS Online web resource

Соединение Compound	Вид биологической активности Type of biological activity							
	Ингибитор тиол-протеазы Thiol protease inhibitor	Противотуберкулезная Antituberculosic	Усилитель экспрессии HMGCS2 HMGCS2 expression enhancer	Антимикобактериальная Antimycobacterial	Ингибитор гистондеацетилазы SIRT1 Histone deacetylase SIRT1 inhibitor	Антагонист Mcl-1 Mcl-1 antagonist	Ингибитор гистондеацетилазы III класса Histone deacetylase class III inhibitor	Противовоспалительная Antiinflammatory
	Pa – вероятность проявления активности, % The probability of activity, %							
3a	80,4	80,2	77,9	73,5	68,4	63,7	59,9	52,4
3b	79,9	83,5	81,9	77,3	63,5	64,1	62,6	52,1
3c	77,8	81,6	74,2	75,0	62,5	58,7	55,9	52,9
3d	74,0	82,5	68,2	74,0	51,5	54,8	47,7	52,7
3e	74,0	82,5	68,2	74,0	51,5	54,8	47,7	52,7
3f	77,5	80,9	78,3	75,1	54,2	63,3	54,9	47,4
3g	79,6	82,1	80,3	76,6	61,3	63,7	61,0	53,3
3h	79,0	80,3	75,1	74,0	62,1	60,4	56,3	52,7
3i	76,9	79,0	72,5	74,1	50,8	55,2	50,8	50,2
3k	78,0	78,4	75,8	69,3	52,7	51,2	57,0	57,7
3l	79,6	82,2	91,3	77,2	54,0	81,6	38,5	45,4
3m	77,8	67,7	86,3	55,7	46,4	72,2	39,9	47,2

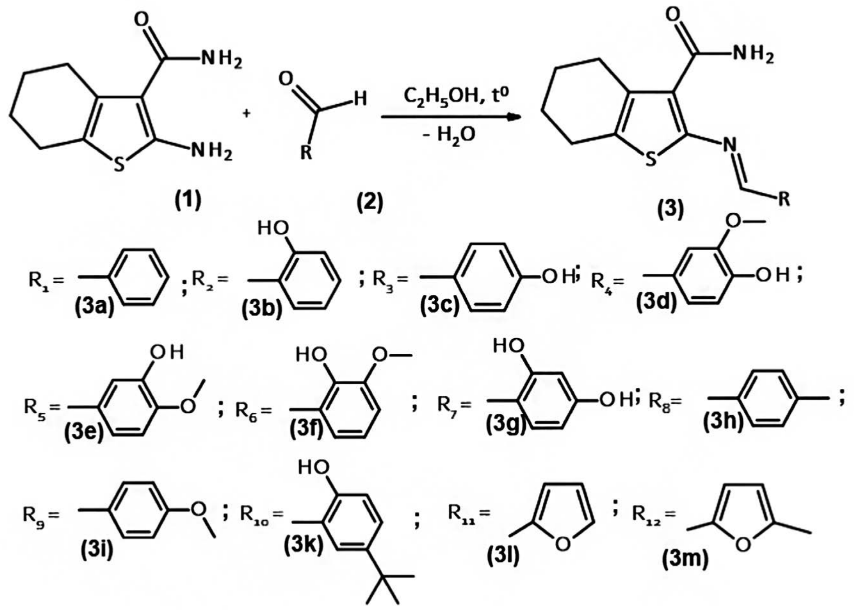


Рисунок 1. **Реакция взаимодействия 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамида с альдегидами**

Figure 1. **Reaction of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide with aldehydes**

ВЭЖХ-анализ с детектированием при неспецифичной длине волны 210 нм показал удовлетворительное разделение синтезированных соединений и посторонних примесей.

В выбранных условиях определения соблюдались приемлемые характеристики хроматографических пиков всех целевых соединений: эффективность – от 5000 до 7900 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии для соединений не превышает 1,5.

Предварительное изучение УФ-светопоглощения растворов синтезированных соединений и исходных веществ в подвижной фазе при 210 нм позволило заключить, что фактор отклика детектора в отношении потенциальных примесных соединений не выходит за границы диапазона 0,8–1,2. Это, в свою очередь, позволило использовать метод внутренней нормализации для оценки содержания целевых веществ и посторонних примесей в синтезированных субстанциях [14]. При расчете не учитывали площади пиков, полученных при хроматографировании подвижной фазы. Результаты оценки чистоты синтезированных субстанций представлены в таблице 2.

Как следует из представленных результатов, целевые соединения обладают высокой чистотой, что важно для проведения первичного фармакологического скрининга и создания лабораторного регламента получения активной фармацевтической субстанции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате компьютерного прогноза и последующего синтеза получен ряд азометиновых производных 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензоти-офен-3-карбоксамида. Высокие выходы продуктов, технологическая простота и экологическая безопасность позволяют оценить перспективность использования оптимизированных условий синтеза азометиновых производных для получения активной фармацевтической субстанции.

Таблица 2. **Результаты оценки чистоты анализируемых соединений методом ВЭЖХ**

Table 2. **Results of the evaluation of the purity of the analyzed compounds by HPLC**

Соединение Compound	Выход, % Yield, %	Содержание целевого компонента, % Content of the target component, %	Относительное время удерживания пика основного соединения, мин The relative retardation time of the peak of the primary compaund, min
3a	93	96,6	6,79
3b	79	98,0	2,06
3c	74	97,5	3,00
3d	80	99,1	3,52
3e	79	97,1	3,62
3f	77	96,2	3,01
3g	71	96,2	1,72
3h	95	99,5	9,09
3i	77	98,8	6,93
3k	79	98,7	6,06
3l	93	97,6	4,66
3m	88	98,8	6,02

Представляется целесообразным исследование фармакологической активности синтезированных соединений и дальнейшее изучение взаимосвязи «структура-активность» соединений данного ряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dzhavakhishvili S. G., Gorobets N. Yu., Musatov V. I., Desenko S. M., Paponov B. V. Three possible products from the reactions of gewald's amide with aromatic aldehydes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2008;45(2):573–577. DOI: 10.1002/jhet.5570450243.
2. Amawi H., Hussein N., Boddu S. H. S., Karthikeyan C., Williams F. E., Ashby C. R., Raman D., Trivedi P., Tiwari A. K. Novel Thienopyrimidine Derivative, RP-010, Induces β-Catenin Fragmentation and Is Efficacious against Prostate Cancer Cells. *Cancers*. 2019;11(5):711. DOI: 10.3390/cancers11050711.
3. Wang Y. D., Johnson S., Powell D., McGinnis J. P., Miranda M., Rabindran S. K. Inhibition of tumor cell proliferation by thieno[2,3-d]pyrimidin-4(1h)-one-based analogs. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 2005;15(16):3763–3766. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.05.127.
4. Zhang Y., Luo L., Han C., Lv H., Chen D., Shen G., Wu K., Pan S., Ye F. Design, Synthesis, and Biological Activity of Tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 2017;22(11):1960. DOI: 10.3390/molecules22111960.
5. Ouyang L., Zhang L., Liu J., Fu L., Yao D., Zhao Y., Zhang S., Wang G., He G., Liu B. Discovery of a small-molecule bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitor that induces AMP-activated protein kinase-modulated autophagy-associated cell death in breast cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(24);9990–10012. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00275.
6. Missio A., Bacher G., Koul A., Choidas A., inventors; Axxima Pharmaceuticals AG., assignee. 4,5,6,7-Tretrahydrobenzo[B] thiophene derivatives and methods for medical intervention against mycrobacterial infections. United States patent US 20090018149. 2009 Jan 15.
7. Zhu W., Chen H., Wang Y., Wang J., Peng X., Chen X., Gao Y., Li C., He Y., Ai J., Geng M., Zheng M., Liu H. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Multisubstituted Pyridin-3-amine Derivatives as Multitargeted Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(14):6018–6035. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00076.
8. El-Sharief A. M. Sh., Micky J. A. A., Shmeiss N. A. M. M., El-Gharieb G. Synthesis and Reactions of Some Tetrahydrobenzothieno[2,3-d] Pyrimidine Derivatives with Biological Interest. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 2003;178(3):439–451. DOI: 10.1080/10426500307912.
9. Ghayour F., Reza M., Shafiee M., Ghashang M. ZnO-CeO_2 nanocomposite: efficient catalyst for the preparation of thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives. *Main Group Metal Chemistry*. 2018;41(1–2):21–26. DOI: 10.1515/mgmc-2017-0038.
10. Филимонов Д. А., Дружиловский Д. С., Лагунин А. А., Глориозова Т. А., Рудик А. В., Дмитриев А. В., Погодин П. В., Поройков В. В. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения. *Биомедицинская химия: исследования и методы*. 2018;1(1):e00004. DOI: 10.18097/bmcrm00004.
11. Leung-Toung R., Zhao Ya., Li W., Tam T., Karimian K., Spino M. Thiol Proteases: Inhibitors and Potential Therapeutic Targets. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13(5):547–581. DOI: 10.2174/092986706776055733.
12. Liu T., Liu P. Y., Marshall G. M. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. *Cancer Research*. 2009;69(5):1702–1705. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3365.
13. Song K.-A., Hosono Ya., Turner C., Jacob S., Lochmann T. L., Murakami Y., Patel N. U., Ham J., Hu B., Powell K. M., Coon C. M., Windle B. E., Oya Y., Koblinski J. E., Harada H., Leverson J. D., Souers A. J., Hata A. N., Boikos S., Yatabe Ya., Ebi H., Faber A. C. Increased Synthesis of MCL-1 Protein Underlies Initial Survival of EGFR-Mutant Lung Cancer to EGFR Inhibitors and Provides a Novel Drug Target. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(22):5658–5672. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0304.
14. Государственная фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. Т. I. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2018. С. 845–872. Доступно по: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/index.html. Ссылка активна на 20.02.2021.

REFERENCES

1. Dzhavakhishvili S. G., Gorobets N. Yu., Musatov V. I., Desenko S. M., Paponov B. V. Three possible products from the reactions of gewald's amide with aromatic aldehydes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2008;45(2):573–577. DOI: 10.1002/jhet.5570450243.
2. Amawi H., Hussein N., Boddu S. H. S., Karthikeyan C., Williams F. E., Ashby C. R., Raman D., Trivedi P., Tiwari A. K. Novel Thienopyrimidine Derivative, RP-010, Induces β-Catenin Fragmentation and Is Efficacious against Prostate Cancer Cells. *Cancers*. 2019;11(5):711. DOI: 10.3390/cancers11050711.
3. Wang Y. D., Johnson S., Powell D., McGinnis J. P., Miranda M., Rabindran S. K. Inhibition of tumor cell proliferation by thieno[2,3-d]pyrimidin-4(1h)-one-based analogs. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 2005;15(16):3763–3766. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.05.127.
4. Zhang Y., Luo L., Han C., Lv H., Chen D., Shen G., Wu K., Pan S., Ye F. Design, Synthesis, and Biological Activity of Tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidine Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 2017;22(11):1960. DOI: 10.3390/molecules22111960.
5. Ouyang L., Zhang L., Liu J., Fu L., Yao D., Zhao Y., Zhang S., Wang G., He G., Liu B. Discovery of a small-molecule bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitor that induces AMP-activated protein kinase-modulated autophagy-associated cell death in breast cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(24);9990–10012. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00275.
6. Missio A., Bacher G., Koul A., Choidas A., inventors; Axxima Pharmaceuticals AG., assignee. 4,5,6,7-Tretrahydrobenzo[B] thiophene derivatives and methods for medical intervention against mycrobacterial infections. United States patent US 20090018149. 2009 Jan 15.
7. Zhu W., Chen H., Wang Y., Wang J., Peng X., Chen X., Gao Y., Li C., He Y., Ai J., Geng M., Zheng M., Liu H. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Multisubstituted Pyridin-3-amine Derivatives as Multitargeted Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(14):6018–6035. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00076.
8. El-Sharief A. M. Sh., Micky J. A. A., Shmeiss N. A. M. M., El-Gharieb G. Synthesis and Reactions of Some Tetrahydrobenzothieno[2,3-d] Pyrimidine Derivatives with Biological Interest. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 2003;178(3):439–451. DOI: 10.1080/10426500307912.
9. Ghayour F., Reza M., Shafiee M., Ghashang M. ZnO-CeO_2 nanocomposite: efficient catalyst for the preparation of thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives. *Main Group Metal Chemistry*. 2018;41(1–2):21–26. DOI: 10.1515/mgmc-2017-0038.
10. Filimonov D. A., Druzhilovskiy D. S., Lagunin A. A., Gloriozova T. A., Rudik A. V., Dmitriev A. V., Pogodin P. V., Poroikov V. V. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitations. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2018;1(1):e00004. (In Russ.) DOI: 10.18097/bmcrm00004.
11. Leung-Toung R., Zhao Ya., Li W., Tam T., Karimian K., Spino M. Thiol Proteases: Inhibitors and Potential Therapeutic Targets. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13(5):547–581. DOI: 10.2174/092986706776055733.
12. Liu T., Liu P. Y., Marshall G. M. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. *Cancer Research*. 2009;69(5):1702–1705. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3365.
13. Song K.-A., Hosono Ya., Turner C., Jacob S., Lochmann T. L., Murakami Y., Patel N. U., Ham J., Hu B., Powell K. M., Coon C. M., Windle B. E., Oya Y., Koblinski J. E., Harada H., Leverson J. D., Souers A. J., Hata A. N., Boikos S., Yatabe Ya., Ebi H., Faber A. C. Increased Synthesis of MCL-1 Protein Underlies Initial Survival of EGFR-Mutant Lung Cancer to EGFR Inhibitors and Provides a Novel Drug Target. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(22):5658–5672. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0304.
14. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii* [State Pharmacopeia of Russian Federation]. XIV edition. V. I. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. P. 845–872. Available at: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php. Accessed: 20.02.2021. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-32-41
УДК 615.453.64

Обзорная статья / Review article

Современные подходы к технологии таблетированных лекарственных форм тиоктовой кислоты (обзор)

С. Н. Егорова[1], И. В. Булыгина[1], Н. В. Воробьева[1]*, Д. П. Чувашова[2], Н. Р. Мустафина[1]

[1] Институт фармации, ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России, 420126, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Фатыха Амирхана, д. 16
[2] АО «Татхимфармпрепараты», 420091, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Беломорская, д. 260

***Контактное лицо:** Воробьева Наталья Владимировна. **E-mail:** vorobieva_nv@kazangmu.ru

ORCID: С. Н. Егорова – https://orcid.org/0000-0001-7671-3179; И. В. Булыгина – https://orcid.org/0000-0003-1917-3262; Н. В. Воробьева – https://orcid.org/0000-0001-5758-9352; Д. П. Чувашова – https://orcid.org/0000-0002-8973-5980; Н. Р. Мустафина – https://orcid.org/0000-0001-9682-5274.

Статья поступила: 28.01.2021 **Статья принята в печать:** 09.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Тиоктовая (α-липоевая) кислота является эндогенным антиоксидантом и применяется при заболеваниях печени, отравлении солями тяжелых металлов, гиперлипидемии, атеросклеротической болезни сердца, нейропатии, инсулинорезистентных формах сахарного диабета и др. В обзоре представлен анализ научной и патентной литературы по проблеме выбора состава и обоснования технологии получения таблетированных лекарственных препаратов тиоктовой кислоты, необходимый для фармацевтической разработки таблеток тиоктовой кислоты на предприятиях фармацевтической промышленности.

Текст. В обзоре рассмотрены физико-химические свойства фармацевтической субстанции тиоктовой кислоты, особенности ее фармацевтико-технологических свойств, совместимость со вспомогательными веществами. В технологии таблеток тиоктовой кислоты применяют методы прямого прессования и прессования с предварительной влажной грануляцией, в том числе с использованием органических растворителей. Для повышения фотостабильности таблетки тиоктовой кислоты покрывают оболочкой. Представлена информация о вспомогательных веществах в составе таблеток-ядер и пленочной оболочки таблеток тиоктовой кислоты, зарегистрированных в России. Изложены проблемы таблетирования тиоктовой кислоты: спекание гранулята в процессе сушки, налипание таблетируемой массы на пресс-инструмент и обусловленные этим неровности поверхности таблеток. Рассмотрены пути оптимизации процесса таблетирования тиоктовой кислоты использованием различных композиций вспомогательных веществ, улучшением сыпучести фармацевтической субстанции как при ее синтезе, так и в результате технологической обработки, выбором оптимальных режимов гранулирования, сушки, прессования.

Заключение. В результате анализа литературных данных были выявлены особенности технологии получения таблеток тиоктовой кислоты, которые обусловлены ее высоким содержанием в таблетках (до 600 мг), необходимостью использования минимального количества вспомогательных веществ (от 27 до 51 %), плохой сыпучестью, низкой температурой плавления фармацевтической субстанции. Улучшение прессуемости и предотвращение налипания возможно обеспечить использованием фармацевтической субстанции тиоктовой кислоты определенного гранулометрического состава, вспомогательных веществ основной природы и высоким содержанием скользящих веществ (до 6 %). Выявленные особенности следует учитывать при фармацевтической разработке таблеток тиоктовой кислоты.

Ключевые слова: тиоктовая кислота, липоевая кислота, таблетки, состав, технология

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в сборе и обработке данных научной и патентной литературы, написании статьи и обсуждении результатов.

Для цитирования: Егорова С. Н., Булыгина И. В., Воробьева Н. В., Чувашова Д. П., Мустафина Н. Р. Современные подходы к технологии таблетированных лекарственных форм тиоктовой кислоты. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):32–41. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-32-41

Modern Approaches to the Technology of Tablet Dosage Forms of Thioctic Acid (Review)

Svetlana N. Egorova[1], Irina V. Bulygina[1], Natalia V. Vorobeva[1]*, Dinara P. Chuvashova[2], Naira R. Mustafina[1]

[1] Institute of Pharmacy, Kazan State Medical University, 16, Fatykha Amirkhan str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420126, Russia
[2] JSC Tatkhimpharmpreparaty, 260, Belomorskaya str., Kazan, Republic of Tatarstan, 420091, Russia

***Corresponding author:** Natalia V. Vorobeva. **E-mail:** vorobieva_nv@kazangmu.ru

ORCID: Svetlana N. Egorova – https://orcid.org/0000-0001-7671-3179; Irina V. Bulygina – https://orcid.org/0000-0003-1917-3262; Natalia V. Vorobeva – https://orcid.org/0000-0001-5758-9352; Dinara P. Chuvashova – https://orcid.org/0000-0002-8973-5980; Naira R. Mustafina – https://orcid.org/0000-0001-9682-5274.

Received: 28.01.2021 **Revised:** 09.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Thioctic (α-lipoic) acid is an endogenous antioxidant and is used for liver diseases, poisoning with salts of heavy metals, hyperlipidemia, atherosclerotic heart disease, neuropathy, insulin-resistant forms of diabetes mellitus, etc. technologies for producing tabletted medicinal preparations of thioctic acid, necessary for the pharmaceutical development of thioctic acid tablets at pharmaceutical industry enterprises.

Text. The review considers the physicochemical properties of the pharmaceutical substance thioctic acid, the features of its pharmaceutical and technological properties, and compatibility with excipients. In the technology of thioctic acid tablets, methods of direct compression and compression with preliminary wet granulation, including those using organic solvents, are used. To increase photostability, thioctic acid tablets

are coated. Information on excipients in the composition of core tablets and film coat of thioctic acid tablets registered in Russia is presented. The problems of tabletting thioctic acid are described: sintering of the granulate during the drying process, adhesion of the tabletting mass to the pressing tool and the resulting unevenness of the tablet surface. The ways of optimizing the tabletting process of thioctic acid using various compositions of excipients, improving the flowability of a pharmaceutical substance both during its synthesis and as a result of technological processing, choosing the optimal modes of granulation, drying, pressing are considered.
Conclusion. As a result of the analysis of the literature data, the features of the technology for producing thioctic acid tablets were revealed, which are due to the high content of the pharmaceutical substance in tablets (up to 600 mg), the need to use a minimum amount of excipients (from 27 to 51 %), poor flowability, and low melting point of the pharmaceutical substance. Improvement of compressibility and prevention of adhesion can be achieved by using the pharmaceutical substance thioctic acid of a certain granulometric composition, auxiliary substances of the basic nature and a high content of glidants (up to 6 %). The identified manufacturing features should be taken into account in the pharmaceutical development of thioctic acid tablets.

Keywords: thioctic acid, lipoic acid, tablets, composition, technology

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. All authors participated in the collection and processing of scientific and patent literature data, writing the article and discussing the results.

For citation: Egorova S. N., Bulygina I. V., Vorobeva N. V., Chuvashova D. P., Mustafina N. R. Modern approaches to the technology of tablet dosage forms of thioctic acid. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2021;10(2):32–41. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-32-41

ВВЕДЕНИЕ

Тиоктовая (α-липоевая) кислота была выделена в кристаллическом виде из экстракта говяжьей печени в 1951 году. Тиоктовая кислота регулирует процессы энергообразования в клетке, при поступлении в организм восстанавливается до дигидролипоевой кислоты, которая обеспечивает основные терапевтические эффекты при заболеваниях печени (острый гепатит А, хронический гепатит, фиброз, цирроз печени, дегенерация печени), отравлении солями тяжелых металлов, гиперлипидемии, атеросклеротической болезни сердца [1]. Тиоктовая кислота применяется для лечения пациентов с нейропатией соматогенного происхождения, при инсулинорезистентных формах сахарного диабета [2].

Имеются данные о свойствах различных солей тиоктовой кислоты, входящих в состав лекарственных препаратов (ЛП) для парентерального применения: меглюминовая и трометамоловая соли тиоктовой кислоты оказывают меньше побочных эффектов, чем этилендиаминовая соль [3].

Оригинальным ЛП тиоктовой кислоты является Тиоктацид® (Meda Pharma GmbH & Co.KG, Германия), применяющийся как нейропротекторное, гепатопротекторное, эндопротекторное средство [4] и выпускаемый в двух лекарственных формах (ЛФ): таблетки, покрытые пленочной оболочкой Тиоктацид® БВ, содержащие 600 мг тиоктовой кислоты, и раствор Тиоктацид® 600 Т для внутривенного введения в ампулах 24 мл, содержащий тиоктата трометамол в пересчете на тиоктовую кислоту 25 мг/мл [5].

Выпускаемые таблетированные ЛП тиоктовой кислоты отличаются по степени высвобождения активного вещества (обычное и пролонгированное высвобождение). Разница в биодоступности и высокая вариабельность концентрации в плазме крови пероральных ЛП тиоктовой кислоты не позволяют говорить об их взаимозаменяемости [6].

Одним из основных направлений государственной политики Российской Федерации по развитию фармацевтической промышленности на период до 2030 года является существенное увеличение объема и номенклатуры производства фармацевтической продукции для обеспечения внутреннего рынка [7]. Фармацевтическая разработка ЛП, в том числе воспроизведенных, на каждом предприятии предусматривает научное обоснование их состава и технологии, для чего необходимо изучение научной литературы, а для выявления охраноспособных фармацевтико-технологических решений – изучение патентной документации.

Цель настоящего обзора – анализ научной и патентной литературы по проблеме выбора состава и технологии получения таблетированных ЛП тиоктовой кислоты для фармацевтической разработки таблеток тиоктовой кислоты отечественного производства.

Особенности фармацевтической разработки таблеток тиоктовой кислоты обусловлены как дозировками, так и физико-химическими свойствами фармацевтической субстанции.

Субстанция тиоктовой кислоты представляет собой желтый кристаллический порошок без запаха, очень мало растворимый в воде, растворимый в метаноле, диметилформамиде [8, 9].

Тиоктовая кислота фармацевтически несовместима с молекулами сахаров вследствие образования труднорастворимых соединений. Это ограничивает совместное использование инъекционной формы тиоктовой кислоты с раствором глюкозы и содержащими ее ЛП (например, раствор Рингера), а также с соединениями, взаимодействующими с дисульфидными и сульфгидрильными группами. Тиоктовая кислота взаимодействует с ионами металлов (железа, кальция, магния), образуя соли [10], что необходимо принимать во внимание при получении таблетированных ЛФ. В технологии ЛФ и при выборе упаковки ЛП тиоктовой кислоты следует также учитывать уменьшение ее стабильности под действием влаги и света [11, 12].

Для повышения стабильности тиоктовой кислоты используют ощелачивающие агенты (например, меглумин в ЛП «Тиогамма®, раствор для инфузий») [13]. Карбонат и гидрокарбонат натрия повышают стабильность, а также растворимость тиоктовой кислоты [11, 12]. Имеются данные о повышении растворимости и фотостабильности тиоктовой кислоты при образовании ее комплекса с β-циклодекстрином, гидроксипропил-β-циклодекстрином [11, 12].

По данным Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) [14], по состоянию на 15.01.2021 г., в РФ зарегистрированы 16 торговых наименований таблетированных ЛП с действующим веществом «тиоктовая кислота» [14]. Анализ составов ЛП, представленных в ГРЛС, показал, что для получения таблеток-ядер (таблица 1) и оболочки (таблица 2) таблеток тиоктовой кислоты отечественными и зарубежными производителями используются вспомогательные вещества (ВВ) различных групп: наполнители, скользящие, гранулирующие агенты и др. [13, 15–19].

В таблетках тиоктовой кислоты содержится малое количество ВВ (от 27 до 51 %, что связано с высокой дозировкой тиоктовой кислоты – 300 и 600 мг соответственно), обеспечивающей возможность однократного приема терапевтической дозы. При увеличении доли ВВ таблетки будет трудно проглотить вследствие их большого размера.

Скользящие (смазывающие) ВВ используются в высоких концентрациях (2–6 %). Это необходимо для предотвращения налипания таблетируемой массы на пуансоны, поскольку тиоктовая кислота имеет низкую температуру плавления – от 60 до 62 °C [20], а ее энантиомеры – 47 °C (R-тиоктовая кислота) и 46 °C (S-тиоктовая кислота) [21, 22]. Высокие дозы тиоктовой кислоты приводят к проблемам с прессованием таблеток: формовочные смеси имеют тенденцию прилипать к прессовальным инструментам из-за локального перегрева. Кроме того, на поверхности таблеток появляются трещины, а у двояковыпуклых таблеток отламываются сферические крышки [21]. Также вследствие низкой температуры плавления тиоктовой кислоты существует риск возникновения нежелательного плавления и спекания гранулята во время процессов сушки при влажной грануляции [22].

Производители широко используют в качестве скользящего/смазывающего компонента кальция и/или магния стеарат, в то время как тиоктовая кислота способна образовывать соли с ионами металлов (кальция, магния) [10], и это может явиться причиной изменения показателей качества при хранении ЛП.

Несмотря на то что фармакологические свойства и медицинское применение тиоктовой кислоты описаны в многочисленных публикациях, основным источником сведений о составе и технологии ЛП тиоктовой кислоты являются патентные базы данных. Патентный поиск проводился в базе данных Европейского патентного ведомства Espacenet [23] по основной области запроса «thioctic acid» и «lipoic acid», а также в базе данных патентов на изобретения Федерального института промышленной собственности [24] с запросом «липоевая кислота», «тиоктовая кислота», из которых выбраны и изучены патенты, включающие данные о ЛФ тиоктовой кислоты, защищающие способы синтеза субстанции тиоктовой кислоты и состав и технологию получения таблетированных ЛП, содержащих тиоктовую кислоту.

Способы синтеза, описанные в патентах [25–28], позволяют получить субстанцию тиоктовой кислоты с улучшенными технологическими свойствами (сыпучестью, гранулометрическим составом), высоким выходом и чистотой. Получена субстанция тиоктовой кислоты с насыпной массой от 500 до 900 г/л [25], позволяющая изготавливать таблетки методом прямого прессования без таких отрицательных явлений, как прилипание к пресс-форме или растрескивание таблеток, которые характерны для получаемых в настоящее время форм тиоктовой кислоты. По данному способу структурный гранулят получают в псевдоожиженном слое при распылительной сушке раствора тиоктовой кислоты. Возможно напыление раствора тиоктовой кислоты на загрузку порошка данной фармацевтической субстанции. Гранулометрический состав образующегося гранулята (от 125 до 710 мкм) по изобретению можно регулировать соответствующим выбором таких параметров, как температура продукта, давление, при котором проводят распыление, расходуемое количество распыляемого раствора, конструктивные особенности распылительных сопел и варьирование их размещения.

Получение таблеток тиоктовой кислоты методом влажной грануляции описано в источниках [25, 29–31, 21].

Патент RU 2159240 [25] описывает способы получения ЛФ с дозировкой тиоктовой кислоты более 200 мг прессованием с предварительной влажной грануляцией. В качестве ВВ использовались: лактоза (150,0 мг), микрокристаллическая целлюлоза (MCC Sanaq® 101 L или Avicel® PH-101 106,0 мг), кукурузный крахмал (27,0 мг), поливидон (Kollidon® 25 9,0 мг), стеарат магния (6,0 мг), высокодисперсный диоксид кремния (Аэросил® 200 2,0 мг). Тиоктовую кислоту, полученную с использований органических растворителей, лактозу, часть микрокристаллической целлюлозы, кукурузный крахмал смешивали и увлажняли 8,4 % раствором Kollidon® 25 и водой, высушивали при температуре 40–60 °C 60–90 мин. Затем добавляли оставшуюся часть микрокристаллической целлюлозы, Аэросил® 200 и стеарат магния, прессовали, покрывали оболочкой. При прессовании не наблюдалось прилипания таблеток к таблетирующему устройству и растрескивания.

Таблица 1. Составы ВВ таблеток-ядер тиоктовой кислоты, зарегистрированных в РФ [14]

Table 1. The compositions of the excipients of the tablets-cores thioctic acid, registered in Russia [14]

Торговое наименование, держатель/владелец регистрационного удостоверения, страна Trade name, marketing authorization holder/owner, country	ВВ таблетки-ядра, мг (дозировка 300 мг / дозировка 600 мг) Excipients of the tablet core, mg (dosage 300 mg / dosage 600 mg)				
	Наполнитель Filler	Разрыхлитель (дезинтегрант) Baking powder (disintegrant)	Связывающее Binding substance	Скользящее (смазывающее) Lubricant	Абсорбент Absorbent
1	2	3	4	5	6
Тиоктацид® БВ (600 мг; «Меда Фарма ГмбХ и Ко.КГ», Германия) Thioctacid® BV (600 mg; Meda Pharma GmbH & Co.KG, Germany)	гипролоза низкозамещенная 157,00 low-substituted hyprolosis 157.00		гипролоза 20,00 hyprolosis 20.00	магния стеарат 24,00 magnesium stearate 24.00	
Тиогамма® (600 мг; «ВервагФарма-ГмбХ и Ко. КГ», Германия) Thiogamma® (600 mg; Woerwag Pharma GmbH & Co. KG, Germany)	лактозы моногидрат 49,0 lactose monohydrate 49.0	целлюлоза микрокристаллическая 49,0 microcrystalline cellulose 49.0; кармеллоза натрия 16,00 carmellose sodium 16.00	гипромеллоза 25,00 hypromellose 25.00	тальк 36,364 talc 36.364; магния стеарат 16,00 magnesium stearate 16.00	кремния диоксид коллоидный 25,00 colloidal silicon dioxide 25.00; симетикон 3,636 simethicone 3.636
Тиолепта® (300 мг, 600 мг; ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия) Thiolepta® (300 mg, 600 mg; CJSC Kanonpharma production, Russia)	лактозы моногидрат 116/232 lactose monohydrate 116/232	крахмал картофельный 13,7/24,7 potato starch 13.7/24.7; кроскармеллоза натрия 24,8/49,6 croscarmellose sodium 24.8/49.6; целлюлоза микрокристаллическая 83,6/167,2 microcrystalline cellulose 83.6/167.2	повидон К-30 32,6/65,2 povidone K-30 32.6/65.2	кальция стеарат 15,5/31,0 calcium stearate 15.5/31.0	кремния диоксид коллоидный 13,8/27,6 colloidal silicon dioxide 13.8/27.6
Берлитион® 300 (300 мг; ЗАО «БЕРЛИН-ФАРМА», Россия) Berlition® 300 (300 mg; CJSC BERLIN-PHARMA, Russia)	лактозы моногидрат 60,00 lactose monohydrate 60.00	кроскармеллоза натрия 24,00 croscarmellose sodium 24.00; целлюлоза микрокристаллическая 165,0 microcrystalline cellulose 165.0	повидон К-30 21,00 povidone K-30 21.00	магния стеарат 12,00 magnesium stearate 12.00	кремния диоксид коллоидный 18,00 colloidal silicon dioxide 18.00
Эспа-Липон® (600 мг; «Эспарма ГмбХ», Германия) Espa-Lipon® (600 mg; Esparma GmbH, Germany)	лактозы моногидрат 289,0 lactose monohydrate 289.0	целлюлоза микрокристаллическая 33,0 microcrystalline cellulose 33.0; целлюлозы порошок 22,0 cellulose powder 22.0; карбоксиметилкрахмал натрия 44,0 sodium carboxymethyl starch 44.0	повидон К-25 29,5 povidone K-25 29.5	магния стеарат 44,0 magnesium stearate 44.0	кремния диоксид коллоидный 11,0 colloidal silicon dioxide 11.0; кремния диоксид 27,5 silicon dioxide 27.5
Тиоктовая кислота-ВЕРТЕКС (600 мг; АО «ВЕРТЕКС», Россия) Thioctic acid-VERTEX (600 mg; JSC VERTEX, Russia)	лактозы моногидрат 212,0 lactose monohydrate 212.0; гипролоза низкозамещенная 110,0 low-substituted hyprolosis 110.0	целлюлоза микрокристаллическая 102,0–90,0 microcrystalline cellulose 102.0–90.0	гипролоза 22,0 hyprolosis 22.0	магния стеарат 33,0 magnesium stearate 33.0	кремния диоксид коллоидный 33,0 colloidal silicon dioxide 33.0

Окончание таблицы 1

Торговое наименование, держатель/владелец регистрационного удостоверения, страна Trade name, marketing authorization holder/owner, country	**ВВ таблетки-ядра, мг (дозировка 300 мг / дозировка 600 мг)** Excipients of the tablet core, mg (dosage 300 mg / dosage 600 mg)				
	Наполнитель Filler	**Разрыхлитель (дезинтегрант)** Baking powder (disintegrant)	**Связывающее** Binding substance	**Скользящее (смазывающее)** Lubricant	**Абсорбент** Absorbent
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Липоевая кислота (300 мг, 600 мг; ОАО «Марбиофарм», Россия) Lipoic Acid (300 mg, 600 mg; JSC Marbiopharm, Russia)	лактозы моногидрат 60,0/120 lactose monohydrate 60.0/120	целлюлоза микрокристаллическая 165/330 microcrystalline cellulose 165/330; кроскармеллоза 24/48 croscarmellose 24/48	повидон К-30 21/42 povidone K-30 21/42	магния стеарат 12/24 magnesium stearate 12/24	кремния диоксид коллоидный 18/36 colloidal silicon dioxide 18/36
Тиоктовая кислота-Виал (300 мг, 600 мг; ООО «ВИАЛ», Россия) Thioctic Acid Vial (300 mg, 600 mg; LLC VIAL, Russia)	целлюлоза микрокристаллическая 264,76/168,12 microcrystalline cellulose 264.76/168.12	крахмал кукурузный 86,00/41,70 corn starch 86.00/41.70; карбоксиметилкрахмал натрия (тип А) 12,00/20,00 sodium carboxymethyl starch (type A) 12.00/20.00; кроскармеллоза натрия 8,00/12,00 croscarmellose sodium 8.00/12.00	повидон К-30 10,00/13,35 povidone K-30 10.00/13.35	магния стеарат 6,80/8,70 magnesium stearate 6.80/8.70; тальк 6,60/8,35 talc 6.60/8.35	кремния диоксид коллоидный 5,00/6,70 colloidal silicon dioxide 5.00/6.70
Тиоктовая кислота (300 мг, 600 мг; ООО «Атолл», Россия) Thioctic acid (300 mg, 600 mg; (LLC Atoll, Russia)	целлюлоза микрокристаллическая 165,0/330,0 microcrystalline cellulose 165.0/330.0; лактозы моногидрат 60,0/120,0 lactose monohydrate 60.0/120.0	кроскармеллоза натрия 24,0/48,0 croscarmellose sodium 24.0/48.0	повидон К-25 21,0/42,0 povidone K-25 21.0/42.0	магния стеарат 12,0/24,0 magnesium stearate 12.0/24.0	кремния диоксид коллоидный 18,0/36,0 colloidal silicon dioxide 18.0/36.0
Октолипен® (600 мг; ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия) Octolipen® (600 mg; OJSC Pharmstandard-Tomskkhimfarm, Russia)	гипролоза низкозамещенная 120,90 low-substituted hyprolosis 120.90		гипролоза 32,04 hyprolosis 32.04	магния стеарат 24,03 magnesium stearate 24,03	кремния диоксид коллоидный 24,03 colloidal silicon dioxide 24.03
Тиолипон (300 мг, 600 мг; ПАО «Биосинтез», Россия) Thiolipon (300 mg, 600 mg; PJSC Biosintez, Russia)	целлюлоза микрокристаллическая 50/41 microcrystalline cellulose 50/41; лактозы моногидрат 91,5/80,6 lactose monohydrate 91.5/80.6	карбоксиметилкрахмал натрия (примогель) 17,5/28,7 sodium carboxymethyl starch (primogel) 17.5/28.7	гипромеллоза 5/8,2 hypromellose 5/8.2	магния стеарат 5/8,2 magnesium stearate 5/8.2; кальция стеарата моногидрат 5/8,2 calcium stearate monohydrate 5/8.2; натрия стеарилфумарат 5/8,2 sodium stearyl fumarate 5/8.2; тальк 13,5/24,6 talc 13.5/24.6	кремния диоксид коллоидный 7,5/12,3 colloidal silicon dioxide 7.5/12.3

Таблица 2. Составы ВВ оболочки таблеток тиоктовой кислоты, зарегистрированных в РФ [14]

Table 2. Compositions of excipients of the shell of thioctic acid tablets registered in Russia [14]

Торговое наименование, держатель/владелец регистрационного удостоверения, страна Trade name, marketing authorization holder/owner, country	ВВ пленочной оболочки, мг (дозировка 300 мг / дозировка 600 мг) Excipients of the film shell, mg (dosage 300 mg / dosage 600 mg)			
	Пленкообразователь (полимер) Film former (polymer)	Пигмент (краситель) Pigment (dye)	Пластификатор Plasticizer	Лубрикант Lubricant
1	2	3	4	5
Тиоктацид® БВ (600 мг; «Меда Фарма ГмбХ и Ко.КГ», Германия) Thioctacid® BV (600 mg; Meda Pharma GmbH & Co.KG, Germany)	гипромеллоза 15,80 hypromellose 15.80	титана диоксид 4,00 titanium dioxide 4.00; алюминиевый лак на основе красителя хинолиновый желтый 1,32 dye-based aluminum varnish quinoline yellow 1.32; алюминиевый лак на основе индигокармина 0,16 indigo carmine-based aluminum varnish 0.16	макрогол 6000 4,70 macrogol 6000 4.70	тальк 2,02 talc 2.02
Тиогамма® (600 мг; «Верваг Фарма ГмбХ и Ко. КГ», Германия) Thiogamma® (600 mg; Woerwag Pharma GmbH & Co. KG, Germany)	гипромеллоза 2,80 hypromellose 2.80		макрогол 6000 0,60 macrogol 6000 0.60	тальк 2,00 talc 2.00; натрия лаурилсульфат 0,025 sodium lauryl sulfate 0.025
Тиолепта® (300 мг, 600 мг; ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия) Thiolepta® (300 mg, 600 mg; CJSC Kanonpharma production Russia	гипромеллоза 6,8/13,6 hypromellose 6.8/13.6; гипролоза 7/14 hyprolosis 7/14	титана диоксид 5,37/10,74 titanium dioxide 5.37/10.74; краситель железа оксид желтый 0,826/1,652 iron dye oxide yellow 0.826/1.652; краситель солнечный закат желтый 0,004/0,008 dye solar sunset yellow 0.004/0.008		
Берлитион® 300 (300 мг; ЗАО «БЕРЛИН-ФАРМА», Россия) Berlition® 300 (300 mg; CJSC BERLIN-PHARMA, Russia)	гипромеллоза 6,5970 hypromellose 6.5970	титана диоксид (Е 171) 3,9134 titanium dioxide (E 171) 3.9134; краситель хинолиновый желтый (Е 104) 0,0750 dye quinoline yellow (E 104) 0.0750; краситель солнечный закат желтый (Е 110) 0,0290 dye solar sunset yellow (E 110) 0.0290	парафин жидкий 3,6760 liquid paraffin 3.6760	натрия лаурилсульфат 0,7096 sodium lauryl sulfate 0.7096
Эспа-Липон® (600 мг; « Эспарма ГмбХ», Германия) Espa-Lipon® (600 mg; Esparma GmbH, Germany)	гипромеллоза 4,5 hypromellose 4.5	титана диоксид (Е 171) 1,125 titanium dioxide (E 171) 1.125; краситель хинолиновый желтый (Е 104) 0,225 dye quinoline yellow (E 104) 0.225	макрогол-6000 0,5 macrogol-6000 0.5	тальк 1,395 talc 1.395
Тиоктовая кислота-ВЕРТЕКС (600 мг; АО «ВЕРТЕКС», Россия) Thioctic acid-VERTEX (600 mg; JSC VERTEX, Russia)	гипромеллоза 20,0 hypromellose 20.0; гипролоза 7,760 hyprolosis 7.760	титана диоксид 4,348 titanium dioxide 4.348; краситель железа оксид желтый 0,188 iron dye oxide yellow 0.188		тальк 7,704 talc 7.704

Окончание таблицы 2

Торговое наименование, держатель/владелец регистрационного удостоверения, страна **Trade name, marketing authorization holder/owner, country**	**ВВ пленочной оболочки, мг (дозировка 300 мг / дозировка 600 мг)** **Excipients of the film shell, mg (dosage 300 mg / dosage 600 mg)**			
	Пленкообразователь (полимер) **Film former (polymer)**	**Пигмент (краситель)** **Pigment (dye)**	**Пластификатор** **Plasticizer**	**Лубрикант** **Lubricant**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Липоевая кислота (300 мг, 600 мг; ОАО «Марбиофарм», Россия) Lipoic Acid (300 mg, 600 mg; JSC Marbiopharm, Russia)	гипромеллоза 2910 6,597/13,194 hypromellose 2910 6.597/13.194	титана диоксид 3,9134/7,8268 titanium dioxide 3.9134/7.8268; краситель хинолиновый желтый 0,075/0,150 dye quinoline yellow 0.075/0.150; краситель солнечный закат желтый 0,029/0,058 dye solar sunset yellow 0.029/0.058	парафин жидкий 0,676/1,352 liquid paraffin 0.676/1.352; парафин жидкий 3/6 liquid paraffin 3/6	натрия лаурилсульфат 0,7096/1,4192 sodium lauryl sulfate 0.7096/1.4192
Тиоктовая кислота-Виал (300 мг, 600 мг; ООО «ВИАЛ», Россия) Thioctic Acid Vial (300 mg, 600 mg; LLC VIAL, Russia)	гипромеллоза 15 сП 11,10/13,54 hypromellose 15 cp 11.10/13.54; гипромеллоза 5 сП 2,19/2,72 hypromellose 5 cp 2.19/2.72	титана диоксид 3,40/3,35 titanium dioxide 3.40/3.35	дибутилсебакат 3,13/3,78 dibutylsebakat 3.13/3.78	кремния диоксид коллоидный 1,30/1,65 colloidal silicon dioxide 1.30/1.65; тальк 0,88/0,96 talc 0.88/0.96
Тиоктовая кислота (300 мг, 600 мг; ООО «Атолл», Россия) Thioctic acid (300 mg, 600 mg; LLC Atoll, Russia)	гипромеллоза 5,0/10,0 hypromellose 5.0/10.0; гипролоза 3,55/7,1 hyprolosis 3.55/7.1	титана диоксид 4,25/8,5 titanium dioxide 4.25/8.5; краситель хинолиновый желтый 0,1/0,2 dye quinoline yellow 0.1/0.2	макрогол-4000 2,1/4,2 macrogol-4000 2.1/4.2	
Октолипен® (600 мг; ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия) Octolipen® (600 mg; OJSC Pharmstandard-Tomskkhimfarm, Russia)	гипромеллоза hypromellose	титана диоксид titanium dioxide; хинолинового желтого алюминиевый лак (E 104) quinoline yellow aluminum varnish (E 104); краситель железа оксид желтый (E 172) iron dye yellow oxide (E 172)	макрогол-6000 macrogol-6000	тальк talc
Тиолипон (300 мг, 600 мг; ПАО «Биосинтез», Россия) Thiolipon (300 mg, 600 mg; PJSC Biosintez, Russia)	гипромеллоза 3,4/4,1 hypromellose 3.4/4.1	титана диоксид 2/2,4 titanium dioxide 2/2.4; алюминиевый лак на основе желтого хинолинового 0,40/0,48 aluminum varnish based on yellow quinoline 0.40/0.48; алюминиевый лак на основе желтого солнечный закат 0,05/0,06 sunset yellow-based aluminum varnish 0.05/0.06; алюминиевый лак на основе индигокармина 0,05/0,06 indigo carmine-based aluminum varnish 0.05/0.06	макрогол-4000 1,1/1,3 macrogol-4000 1.1/1.3	

Таблетки тиоктовой кислоты [29] с дозировкой 300 и 600 мг получали смешиванием тиоктовой кислоты (55–80 %), микрокристаллической целлюлозы (2–10 %) и лактозы, увлажнением раствором гидроксипропилметилцеллюлозы (0,7–1,1 %) в смеси воды и этилового спирта. Увлажненную массу перемешивали, высушивали, гранулировали, добавляли алюмометасиликат магния (0–10 %), примогель (2–5 %), стеарат магния (0–1,0 %) и/или кальция (0,5–1,0 %), стеарилфумарат натрия (0–2 %), аэросил (0–5 %) и/или тальк (0–3 %), таблетировали и покрывали оболочкой Opadry II (2–5 %). Получаемый лекарственный препарат стабилен при хранении, однако использование этанола повышает пожароопасность производства.

Авторы изобретения [30] стремились к использованию минимального количества ВВ. Таблетки массой 889,6–938,2 мг имели состав: тиоктовая кислота 600 мг, наполнитель (крахмал, лактоза или их смесь) 150–180 мг, связующее вещество (гидроксиметилцеллюлоза, гипромеллоза, повидон) 20–25 мг, разрыхлитель (карбоксиметилкрахмал натрия, кросповидон, кроскармеллоза) 20–25 мг, лубрикант (стеарат магния, микронизированный силикагель, тальк) 80–90 мг. Пленочная оболочка, защищающая от света при хранении, состояла из основы/пленкообразователя 10–12 мг, замутнителя 5–6 мг, красителя 0,1–0,2 мг, поверхностно-активного вещества 0,5–1 мг, смягчителя 5–6 мг. Технология заключалась в смешивании тиоктовой кислоты, наполнителя, связующих и дезинтегратора, гранулировании, сушке, смешении с лубрикантом, таблетировании ядер и покрытии их оболочкой.

Необходимость уменьшения доли ВВ в таблетках тиоктовой кислоты отмечается также авторами патентов [21, 22, 31]. Патент DE 4317646 [31] защищает состав таблеток тиоктовой кислоты с содержанием активного ингредиента более 45 %. Авторы предлагают улучшить прессуемость таблеток путем добавления ВВ с основными свойствами, например: основные аминокислоты, такие как аргинин или лизин, физиологически совместимые гидроксиды, карбонаты или гидрокарбонаты щелочных или щелочноземельных металлов, гидроксид аммония, амины и др. Таблетки получали способом гранулирования в псевдоожиженном слое, для которого могут использоваться жидкости: спирты с 1–4 атомами углерода, сложные эфиры низших органических кислот и низшие органические спирты (метанол, этанол, изопропанол, бутанол, пропанол и др.), а также вода (предпочтительно). Связующие вещества (производные целлюлозы, желатина, полисахаридов, полигликолей в концентрации 5–15 %) могут быть включены в смесь сухих порошков или растворены (диспергированы) в гранулирующей жидкости. В качестве наполнителей предложены целлюлоза и ее производные, сахароза, лактоза, глюкоза, фруктоза, фосфаты кальция, сульфаты кальция, карбонаты кальция, крахмал, модифицированный крахмал, сорбит, манит; разрыхлителей – крахмал, модифицированный крахмал альгинаты и др.; смазывающих веществ – стеараты магния и кальция, D- и L-лейцин, тальк, стеариновая кислота, полигликоли, жирные спирты или воски.

Влияние размера частиц субстанции тиоктовой кислоты на прессуемость таблеток рассматривается в патенте GR 3033728 [21]. Предложено использование субстанции тиоктовой кислоты, от 20 до 100 % которой имеют размер частиц от 100 до 710 мкм. Использование мелкокристаллической тиоктовой кислоты с размером частиц менее 50 мкм приводит к неудовлетворительным результатам при таблетировании. Решение проблемы налипания к пресс-инструменту в процессе таблетирования заключается в гранулировании активного ингредиента тиоктовой кислоты с большим количеством воды, однако существует риск переувлажнения гранулируемой массы. Кроме того, сушка гранул с высоким содержанием жидкости, как правило, является дорогостоящей и трудоемкой. В технологии получения таблеток тиоктовая кислота может быть увлажнена отдельно или в смеси с ВВ; влажную массу гранулируют, сушат, смешивают с другими ВВ и прессуют таблетки.

Согласно патенту DE 19938098 [22] таблетки, содержащие более 45 % тиоктовой кислоты, получают прямым прессованием тиоктовой кислоты с наполнителями или сухой грануляцией и таблетированием гранул. Используется кристаллическая тиоктовая кислота со средним размером частиц 0,2–1,0 мм. В качестве наполнителей рекомендованы карбонат натрия, сульфаты натрия и калия, карбонат кальция. Установлено, что для прямого прессования предпочтительно использование относительно крупнокристаллической, не измельченной тиоктовой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа литературных данных были выявлены особенности технологии получения таблеток тиоктовой кислоты, которые обусловлены высоким содержанием фармацевтической субстанции в таблетках (до 600 мг), необходимостью использования минимального количества вспомогательных веществ (от 27 до 51 %), плохой сыпучестью, низкой температурой плавления фармацевтической субстанции. Улучшение прессуемости и предотвращение налипания возможно обеспечить использованием фармацевтической субстанции тиоктовой кислоты определенного гранулометрического состава, ВВ основной природы и высоким содержанием скользящих ВВ (до 6 %). В технологии таблеток тиоктовой кислоты применяют методы прямого прессования и прессования с предварительной влажной грануляцией, в том числе с использованием органических растворителей. Для повышения фотостабильности таблетки тиоктовой кислоты покрывают оболочкой. Выявленные особенности изготовления следует учитывать при фармацевтической разработке таблеток тиоктовой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов В. В., Городецкая Г. И., Журавлева М. В., Кукес В. Г., Прокофьев А. Б., Родина Т. А., Сереброва С. Ю., Соколов А. В., Ших Е. В., Абросимов А. Г. Влияние вспомогательных веществ на эффективность и безопасность препаратов тиоктовой кислоты. *РМЖ*. 2016;24(26):1788–1794.
2. Шавловская О. А. Эффективность тиоктовой (альфа-липоевой) кислоты в терапии диабетической полинейропатии. *Эффективная фармакотерапия*. 2016;12:8–14.
3. Корпачев В. В., Борщевская М. И. Лекарственные формы тиоктовой кислоты. *Проблеми ендокринної патології*. 2006;1:74–86.
4. Konrad D. Utilization of the insulin-signaling network in the metabolic actions of alpha-lipoic acid-reduction or oxidation? *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7–8):1032–1039.
5. Кураева Т. Л., Светлова Г. Н., Ходжимирян Н. Л., Петеркова В. А. Тиоктацид БВ – таблетированная форма тиоктовой кислоты второго поколения в лечении периферической диабетической полинейропатии у детей и подростков. *Фарматека*. 2006;5(120):139–144.
6. Белоусов Ю. Б., Афанасьева Е. В., Белоусов Д. Ю., Зырянов С. К. Применение тиоктовой кислоты в терапии диабетической полиневропатии. *Качественная клиническая практика*. 2011;1:85–91.
7. Раднаева С. Э., Мацкевич И. В., Ухакшинова Е. М. Фармацевтическая отрасль в России: анализ и экономические аспекты развития. *Вестник Бурятского государственного университета. Экономика и менеджмент*. 2020;3:31–40.
8. British Pharmacopoeia. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA). London: Thioctic Acid; 2013. P. 1648.
9. European Pharmacopoeia 7.0. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare) Council of Europe. Strasbourg: Thioctic Acid; 2010.
10. Данилов А. Б., Пилипович А. А. Тиоктовая кислота: современная терапия диабетической полиневропатиии. *Эффективная фармакотерапия*. 2017;29:14–20.
11. Racz C.-P., Santa S., Tomoaia-Cotisel M., Borodi G., Kacso I., Pirnau A., Bratu I. Inclusion of a-lipoic acid in b-cyclodextrin. Physical–chemical and structural characterization. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. June 2013;76:193–199.
12. Ikuta N., Okamoto H., Furune T., Uekaji Yu., Terao K., Uchida R., Iwamoto K., Miyajima A., Hirota T., Sakamoto N., Yan B. Academic Editor Bioavailability of an R-α-Lipoic Acid/γ-Cyclodextrin Complex in Healthy Volunteers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):949. DOI: 10.3390/ijms17060949.
13. Городецкая Г. И., Архипов В. В., Журавлева М. В., Кукес В. Г., Прокофьев А. Б., Родина Т. А., Сереброва С. Ю., Соколов А. В., Ших Е. В. Взаимозаменяемость препаратов тиоктовой кислоты. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;9(3):357–364. URL: https://applied-research.ru/ru/article/view?id=10251 (дата обращения: 20.02.2020).
14. Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: http://www.grls.rosminzdrav.ru. Ссылка активна на 21.02.2020.
15. Meyer K., Zimmermann I. Effect of glidants in binary powder mixtures. *Powder Technology*. 2004;139:40–54.
16. Zimmermann I., Eber M., Meyer K. Nanomaterials as flow regulators in dry powders. *Zeitschriftfür Physikalische Chemie*. 2004;218(1):51–102.
17. Ohta K. M., Fuji M., Chikazawa M. Effect of geometric structure of flow promoting agents on the flow properties of pharmaceutical powder mixtures. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(5):804–809.
18. York P. Application of powder failure testing equipment in assessing effect of glidants on flowability of cohesive pharmaceutical powders. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1975;64(7):1216–1221.
19. List P. H., Müller B. W. FST complex III. Mechanism of action of flow-regulating agents. *Pharmazeutische Industrie*. 1972;43(12):963–997.
20. Фармакопея США. USP 29. Национальный формуляр. NF 24. В 2 томах. М: ГЭОТАР-Медиа; 2009. Т. 2. 1800 с.
21. Sarlikiotis W., Hettche H. Tablets containing thioctic acid with a specified size Patent GR 3033728. 31.10.2000.
22. Bauer K. H. Production of solid thioctic acid formulations comprises dry granulation or direct tabletting of active agent with adjuvants Patent DE 19938098. 15.02.2001 г.
23. European Patent Office Database. Available at: https://www.epo.org/searching-for-patents/technical/espacenet.html.
24. Электронная платная база Федерального института промышленной собственности. Доступно по: https://www1.fips.ru/
25. Betge K., Klostermann K., Meller R., Zator G. Способ получения сыпучей r,s-тиоктовой кислоты, r,s-тиоктовая кислота и ее применение. Патент RU 2159240 от 20.11.2000 г.
26. Klatt M. J., Nibel M., Paust J., Riger J. Кристаллическая модификация r- или s- липоевой кислоты и способ получения кристаллической липоевой кислоты. Патент RU 2226528 от 10.04.2004 г.
27. Hornberger J. C. Alpha-lipoic acid process. Patent US 2877235, 10.03.1959.
28. Laban G., Meisel P., Muller G. Method for producing thioctic acid. Patent US 2005107620, 19.05.2005.
29. Клыгина О. Ю., Полунина Е. Е., Шиляева С. В. Состав и способ получения твердой лекарственной формы тиоктовой кислоты. Патент RU 2448699 от 27.04.2012 г.
30. Zhang M. Z. Coated thioctic acid tablet for treating and controlling diabetic neural lesion. Patent CN 1739501, 01.03.2006.
31. Hettche H., Sarlikiotis W. Tablets containing thioctic acid and at least one basic component Patent DE 4317646, 01.12.1994.

REFERENCES

1. Arkhipov V. V., Gorodetskaya G. I., Zhuravleva M. V., Kukes V. G., Prokof'ev A. B., Rodina T. A., Serebrova S. Yu., Sokolov A. V., Shikh E. V., Abrosimov A. G. Vliyanie vspomogatel'nykh veshchestv na effektivnost' i bezopasnost' preparatov tioktovoy kisloty [The influence of excipients on the efficacy and safety of thioctic acid preparations]. *RMZh*. 2016;24(26):1788–1794. (In Russ.)
2. Shavlovskaya O. A. Efficacy of thioctic (alpha-lipoic) acid in treatment of diabetic polyneuropathy. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2016;12:8–14. (In Russ.)
3. Korpachev, V. V., Borshchevskaya M. I. Lekarstvennye formy tioktovoy kisloty [Dosage forms of thioctic acid]. *Problemi endokrinnoï patologiï = Problems of endocrine pathology*. 2006;1:74–86. (In Ukr.)
4. Konrad D. Utilization of the insulin-signaling network in the metabolic actions of alpha-lipoic acid-reduction or oxidation? *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7–8):1032–1039.
5. Kuraeva T. L., Svetlova G. N., Khodzhimiryan N. L., Peterkova V. A. Tioktatsid BV – tabletirovannaya forma tioktovoy kisloty vtorogo pokoleniya v lechenii perifericheskoy diabeticheskoy polineyropatii u detey i podrostkov [Thioctacid BV is a second-generation tablet form of thioctic acid in the treatment of peripheral diabetic polyneuropathy in children and adolescents]. *Farmateka*. 2006;5(120):139–144. (In Russ.)
6. Belousov Yu. B., Afanas'eva E. V., Belousov D. Yu., Zyryanov S. K. Primenenie tioktovoy kisloty v terapii diabeticheskoy polinevropatii [The use of thioctic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy]. *Kachestvennaya Klinicheskaya Praktika = Good Clinical Practice*. 2011;1:85–91. (In Russ.)
7. Radnaeva S. E., Matskevich I. V., Ukhakshinova E. M. Pharmaceutical industry in Russia: analysis and economic aspects of development. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekonomika i menedzhment = BSU bulletin. Economics and management*. 2020;3:31–40. (In Russ.)
8. British Pharmacopoeia. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA). London: Thioctic Acid; 2013. P. 1648.

9. European Pharmacopoeia 7.0. EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare) Council of Europe. Strasbourg: Thioctic Acid; 2010.
10. Danilov A. B., Pilipovich A. A. Thioctic acid: a modern treatment of diabetic polyneuropathy. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2017;29:14–20. (In Russ.)
11. Racz C.-P., Santa S., Tomoaia-Cotisel M., Borodi G., Kacso I., Pirnau A., Bratu I. Inclusion of a-lipoic acid in b-cyclodextrin. Physical–chemical and structural characterization. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. June 2013;76:193–199.
12. Ikuta N., Okamoto H., Furune T., Uekaji Yu., Terao K., Uchida R., Iwamoto K., Miyajima A., Hirota T., Sakamoto N., Yan B. Academic Editor Bioavailability of an R-α-Lipoic Acid/γ-Cyclodextrin Complex in Healthy Volunteers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):949. DOI: 10.3390/ijms17060949.
13. Gorodetskaya G. I., Arkhipov V. V., Zhuravleva M. V., Kukes V. G., Prokofiev A. B., Rodina T. A., Serebrova S. Yu., Sokolov A. V., Shikh E. V. The interchangeability of levotheroxine sodium tablets. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016;9(3):357–364. (In Russ.)
14. *Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv* [State Register of medicines of Russia]. Available at: http://www.grls.rosminzdrav.ru. Accessed 21.02.2020.
15. Meyer K., Zimmermann I. Effect of glidants in binary powder mixtures. *Powder Technology*. 2004;139:40–54.
16. Zimmermann I., Eber M., Meyer K. Nanomaterials as flow regulators in dry powders. *Zeitschriftfür Physikalische Chemie*. 2004;218(1):51–102.
17. Ohta K. M., Fuji M., Chikazawa M. Effect of geometric structure of flow promoting agents on the flow properties of pharmaceutical powder mixtures. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(5):804–809.
18. York P. Application of powder failure testing equipment in assessing effect of glidants on flowability of cohesive pharmaceutical powders. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1975;64(7):1216–1221.
19. List P. H., Müller B. W. FST complex III. Mechanism of action of flow-regulating agents. *Pharmazeutische Industrie*. 1972;43(12):963–997.
20. United States Pharmacopoeia. USP 29. National Form. NF 24. In 2 volumes. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. V. 2. 1800 p. (In Russ.)
21. Sarlikiotis W., Hettche H. Tablets containing thioctic acid with a specified size Patent GR 3033728. 31.10.2000.
22. Bauer K. H. Production of solid thioctic acid formulations comprises dry granulation or direct tabletting of active agent with adjuvants Patent DE 19938098. 15.02.2001 г.
23. European Patent Office Database. Available at: https://www.epo.org/searching-for-patents/technical/espacenet.html.
24. Electronic toll base of the Federal Institute of Industrial Property. Available at: https://www1.fips.ru/ (In Russ.)
25. Betge K., Klostermann K., Meller R., Zator G. *Sposob polucheniya sypuchey r,s-tioktovoy kisloty, r,s-tioktovaya kislota i ee primenenie* [Method for obtaining bulk r, s-thioktic acid, r, s-thioktic acid]. Patent RU 2159240, 20.11.2000. (In Russ.)
26. Klatt M. .J., Nibel M., Paust J., Riger J. *Kristallicheskaya modifikatsiya r- ili s-lipoevoy kisloty i sposob polucheniya kristallicheskoy lipoevoy kisloty* [Crystalline modification of r- or s-lipoic acid and method for preparing crystalline lipoic acid]. Patent RU 2226528, 10.04.2004.
27. Hornberger J. C. Alpha-lipoic acid process. Patent US 2877235, 10.03.1959.
28. Laban G., Meisel P., Muller G. Method for producing thioctic acid. Patent US 2005107620, 19.05.2005.
29. Klygina O. J., Polunina E. E., Shiljaeva S. V. *Sostav i sposob polucheniya tverdoy lekarstvennoy formy tioktovoy kisloty* [Formulation and method for preparing solid dosage form of thioctic acid Patent RU 2448699, 27.04.2012. (In Russ.)
30. Zhang M. Z. Coated thioctic acid tablet for treating and controlling diabetic neural lesion. Patent CN 1739501, 01.03.2006.
31. Hettche H., Sarlikiotis W. Tablets containing thioctic acid and at least one basic component Patent DE 4317646, 01.12.1994.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-42-48
УДК 615.071

Оригинальная статья / Research article

Биофармацевтические исследования при разработке лекарственной формы с метионином и экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)

О. А. Гизингер[1], А. А. Хисамова[2]*

[1] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), кафедра микробиологии и вирусологии, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[2] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), кафедра иммунологии и аллергологии, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

***Контактное лицо:** Хисамова Анна Александровна. **E-mail:** khisamova.ann@gmail.com

ORCID: О. А. Гизингер – https://orcid.org/0000-0001-9302-0155; А. А. Хисамова – https://orcid.org/0000-0003-1221-2150.

Статья поступила: 06.11.2020 **Статья принята в печать:** 17.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Использование композиции на основе экстракта куркумы и метионина может быть эффективно для преодоления последствий окислительного стресса и повреждения компонентов мембран иммуноцитов. Наличие в экстракте из корневищ растения куркумы длинной (*Curcuma longa* L.) биологически активных веществ – куркуминоидов, обладающих антиоксидантными свойствами, делает обоснованным создание на их основе лекарственных средств, способных прогнозировать их эффективность при состояниях, патогенез которых связан с оксидативным стрессом. Форма в виде капсул, содержащая гранулы с экстрактом корневищ куркумы длинной и метионином, может быть использована для коррекции содержания эндогенных и экзогенных активных форм кислорода и ликвидации последствий липопероксидации.

Цель. Проведение биофармацевтических и технологических исследований при разработке состава фармацевтической композиции капсул, содержащих гранулы с экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa* L.) и метионином.

Материалы и методы. Объект исследования – многокомпонентное средство с оригинальным составом, содержащее метионин и жидкий экстракт корневищ куркумы длиной (*Curcuma longa* L.). Состав не имеет аналогов и защищен патентом на изобретение (RU 268 4111). Для оценки биофармацевтических свойств был проведен тест «Растворение» с использованием биорелевантных сред с определением количества веществ в среде с помощью метода УФ-спектрофотометрии. Результаты исследований обработаны статистически в программе Statistica for Windows, version 10, допустимый уровень $p < 0{,}05$.

Результаты и обсуждение. Разработана лекарственная форма капсулы, содержащей гранулы с экстрактом корневищ куркумы длинной и метионин и различный состав вспомогательных веществ. Образцы протестированы по показателю «Растворение». На основе биофармацевтических исследований изучены кинетические закономерности высвобождения действующих веществ из гранул и определены их оптимальные составы. На основании полученных данных выявлена закономерность в улучшении растворимости комбинации метионина и экстракта куркумы относительно стандартных образцов.

Заключение. Полученные результаты говорят о том, что использование композиции, содержащей метионин и экстракт куркумы, позволяет повысить растворимость куркумина за счет введения в состав композиции метионина. Разработанная многокомпонентная фармацевтическая композиция расширит реестр лекарственных средств растительного происхождения отечественного производства для профилактики и лечения заболеваний, вызванных окислительным стрессом.

Ключевые слова: анализ качества, метионин, куркумин, корневища куркумы длинной, УФ-спектрофотометрия, степень высвобождения, тест «Растворение», биорелевантные среды

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Хисамова проводила получение экстракта, приготовление образцов, оценку технологических свойств, высвобождения и написала статью. О. А. Гизингер осуществляла концептуализацию и методологию исследования, а также рецензирование и корретировку статьи. Статья была написана при участии всех соавторов. Все вышеуказанные авторы согласовали итоговую версию статьи.

Для цитирования: Гизингер О. А., Хисамова А. А. Биофармацевтические исследования при разработке лекарственной формы с метионином и экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):42–48. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-42-48

Biopharmaceutical Trials of a Dosage Form, which Contain Methionine and Turmeric Extract (*Curcuma longa* L.)

Oksana A. Gizinger[1], Anna A. Khisamova[2]*

[1] Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Department of Microbiology and Virology, 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[2] Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Department of Immunology and Allergology, 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

***Corresponding author:** Anna A. Khisamova. **E-mail:** khisamova.ann@gmail.com

ORCID: Oksana A. Gizinger – https://orcid.org/0000-0001-9302-0155; Anna A.Khisamova – https://orcid.org/0000-0003-1221-2150.

Received: 06.11.2020 **Revised:** 17.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. The presence of biologically active substances in the extract from the roots of turmeric extract (*Curcuma longa* L.) makes it reasonable and makes it possible to predict their effectiveness in pathological conditions caused by oxidative stress and immune disorders arising against its background. Based on data obtained, a pattern was revealed in improving the solubility of the combination of methionine and turmeric

extract, which includes auxiliary substances. Dosage form – granules with methionine and liquid turmeric extract, with enteric coat can be used to eliminate the consequences of oxidative and immune disorders, treatment and prevention of systemic diseases caused by oxidative stress.
Aim. Biopharmaceutical and in-process tests of the pharmaceutical composition of granules with methionine and liquid turmeric extract.
Materials and methods. The object of the trials was the multicomponent drug containing methionine and a liquid turmeric extract of the roots. The proposed composition of plant compositions is original, had no analogues and protected by a patent for an invention (RU 268 4111). To assess the pharmaceutical properties, biopharmaceutical trials carried out by the UV-spectrophotometric method using biorelevant medium. The research results statistically processed using Statistica for Windows, version 10.
Results and discussion. Based on the data obtained, a pattern revealed in improving the solubility of the combination of methionine and turmeric extract, in contrast to the multicomponent composition containing only turmeric extract.
Conclusion. The developed multicomponent pharmaceutical composition will expand the register of herbal medicines of domestic production for the prevention and treatment of diseases caused by oxidative stress.

Keywords: pharmaceutical analysis, methionine, curcumin, rhizomes of turmeric, UV spectrophotometry, release rate, dissolution test, biorelevant media

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anna A. Khisamova carried out the extraction of the extract, preparation of samples, assessment of technological properties, release. Anna A. Khisamova wrote the article, Oksana A. Gizinger corrected the article. Oksana A. Gizinger carried out conceptualization and research methodology, as well as reviewing and correcting the article. The article was written with the participation of all co-authors. All of the above authors agreed on the final version of the article.

For citation: Gizinger O. A., Khisamova A. A. Biopharmaceutical trials of a dosage form, which contain methionine and turmeric extract (*Curcuma longa* L.). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):42–48. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-42-48

ВВЕДЕНИЕ

Большое распространение получают лекарственные средства и биологически активные добавки на основе растительных компонентов. Удобство, простота применения, возможность стандартизации, малое количество побочных эффектов и безрецептурный статус растительных препаратов делают данное направление перспективным [1].

Пристальное внимание исследователей обращено на растение рода однодольных семейства имбирных (*Zingiberaceae)* – *Curcuma longa* L. Имеющиеся данные о биологической активности куркумина, входящего в состав корневищ, связаны с наличием в его составе диарилгептаноидов, обладающих иммуномодулирующими и антиоксидантными эффектами [2]. В X издании Европейской фармакопеи сообщается, что корневища *Curcuma longa* L. представляют яйцевидные, продолговато-яйцевидные, грушевидные или цилиндрические корневища длиной до 6 см и толщиной 15 мм с пыльной, покрытой пятнами поверхностью и с буровато-желтыми, желтыми или коричневато-серыми тонкими полосами и зернистой, гладкой, не волокнистой, слегка глянцевой, равномерно-желтой трещиной [3]. Куркумин, экстрагируемый из высушенных корневищ *Curcuma longa* L., обладает рядом химических, биологических и фармакологических свойств, реализуемых в антиоксидантном потенциале. Активность в отношении уменьшения свободных форм кислорода определяет плейотропные эффекты относительно мембран клеток [4]. В присутствии куркумина происходит увеличение значения порядка метильных групп, близких к головной части липида в составе клеточной мембраны [5].

Приоритетным вопросом каждого нового лекарственного средства или биологически активной добавки (БАД) является безопасность. Согласно Управлению по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), куркуминоиды считаются безопасными. Данные о безопасности куркумина приводятся в доклинических и клинических исследованиях, но период наблюдения во всех исследованиях ограничивается 16 неделями [6]. По заключению ЕАЭС, безопасной для человека является доза 50 мг, верхняя допустимая доза составляет 150 мг на 1 кг массы тела. Показано, что куркумин не обладает токсическими эффектами. Более того, в отношении слизистых оболочек ЖКТ обладает протективными и восстановительными свойствами [7]. Куркума и куркумин не обладают мутагенной, канцерогенной токсичностью. Специалисты экспертного комитета ВОЗ по пищевым добавкам рекомендовали дозировать потребление куркумы из расчета 3 мг/кг веса в день [8]. Исследования с участием добровольцев показали, что в дозе 6 г/день перорально в течение 4–7 недель и его употребление в дозе 500 мг два раза в день в течение 30 дней безопасны для человека [9].

Проблемой при использовании куркумина является низкая биодоступность. Из-за низкой скорости всасывания в кишечнике и быстрого метаболизма: глюкуронирования и сульфатирования в печени полифенол-куркумин [1,7-бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,6-гептадиен-3,5-ион] не обладает достаточной степенью биодоступности [10]. Было установлено, что куркумин имеет невысокий процент всасывания из кишечника в нижнюю полую вену [11]. Для преодоления проблем растворимости и повышения биодоступности куркумина проводятся исследования с использованием наноносителей и адьювантов-биоэнхансеров [12–16]. Еще одним способом повышения растворимости куркумина является использование его в комплексе с аминокислотой метионином, имеющим подвижную метильную группу с высокой реакционной способностью и возможностью восстанавливать соединения перекисного характера: перекись водорода, надкислоты с образованием молекулярных продуктов [17]. Серосодержащая аминокислота метионин, предлагаемая в составе комплекса, является ценным метаболитом, поскольку участвует в реакциях дезаминирования и является источником атома серы для синтеза цистеина [18]. Метионин может применяться в D-форме, L-форме, D- и L-форме в разных пропорциях [19]. Выбор аминокислоты метионина как компонента фармацевтической композиции обусловлен имеющимися данными о его антиоксидантной активности [20]. Торможение процессов автоокисления липидов метионином достигается путем уменьшения скорости разветвления цепей за счет разрушения гидроперекисей этой аминокислотой без образования свободных радикалов [21]. Мы предполагаем, что комплекс из куркумина и метионина будет повышать биодоступность куркумина в фармацевтической композиции капсулы с гранулированным составом и регулировать процессы липопероксидации за счет усиления активности факторов антиоксидантной защиты.

Цель исследования – проведение биофармацевтических и технологических исследований при разработке состава в форме капсул, содержащих гранулы с метионином и жидким экстрактом куркумы длинной (*Curcuma longa* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили разработанные капсулы, содержащие гранулы с метионином (Sigma, США) и жидким экстрактом корневищ куркумы длинной, который получен из суховоздушного сырья методом мацерации в лабораторных условиях на базе лабораторий фармацевтического факультета ФГОУ ВО ЮУГМУ г. Челябинска. Для получения экстракта в качестве экстрагента был использован спирт этиловый 70 %, в качестве сырья – корневища куркумы длинной (Bharat BAZAAR, Индия, пищевое сырье) в соотношении 1:10 между сырьем и экстрагентом. Перед приготовлением экстракта корневища были предварительно обезжирены гексаном (ЭКОС ЛР-1, ТУ2631-158-44493179-13) в соответствии с алгоритмом, изложенным в патенте RU 2 450 818 C2 (Джиори Андреа, Франчески Федерико). Количественное содержание куркумина на конечной стадии составило 58,45 %, показатели качества экстракта проведены в соответствии с регламентом Государственной фармакопеи XIV издания ОФС.1.4.1.0021.15.

Для определения оптимального состава лекарственной формы были разработаны капсулы, содержащие гранулы с различным составом вспомогательных веществ, определяющие качество гранулируемого материала: прочность гранул, распадаемость, растворение. Основанием для использования нескольких вспомогательных веществ стало отсутствие лабораторно подтвержденного эффекта улучшения растворимости куркумина при использовании только одного из вспомогательных веществ, что дало основание использовать смесь полимеров и наполнителей. При изготовлении гранул были использованы вспомогательные вещества: крахмал (CAS № 9005-25-8, SIGMA, Германия), глюкоза (АО «ЛенРеактив», Россия). В качестве связывающих веществ были использованы полимеры: NaКМЦ (CAS № 9004-32-4, Sigma, США), применяемый в качестве связывающего агента при производстве гранул, и ПВС (CAS № 9002-89-5, SIGMA, Германия) – формообразователь; ПВП 10000 (CAS № 9003-39-8, SIGMA, Германия) использовали для улучшения биодоступности. При растворении гранул в воде полимеры, повышая вязкость раствора, предотвращали выпадение в осадок малорастворимого метионина [22].

При изготовлении гранул использован метод влажного гранулирования. Гранулы получали путем смешивания 0,5 г крахмала, 0,5 г глюкозы, 0,1 г метионина, тщательного перемешивания, вводили в смесь частями 3,5 мл 70%-го спиртового экстракта куркумы, 0,33 мл 5%-го раствора поливинилпирролидона при постоянном перемешивании и высушивали. К высушенной смеси добавляли 0,2 мл 3%-го раствора поливинилового спирта, протирали через сито размером d = 1, высушивали. Составы модельных образцов гранул приведены в таблице 1.

Таблица 1. Составы разработанных гранул с метионином и жидким экстрактом куркумы длинной на одну твердую желатиновую капсулу (№ 000, Sunloc, Индия)

Table 1. Formulations of the developed granules containing methionine and liquid turmeric extract per one hard gelatin capsule (№ 000, Sunloc, India)

№ модельного образца гранул № experimental sample of granules	Действующие вещества Active ingridients		Вспомогательные вещества (г) Excipients (g)				
	Метионин, г Methionine, g	Жидкий экстракт корневищ куркумы длинной, мл Fluid extract of turmeric rhizomes, ml	Крахмал Starch	Глюкоза Glucose	NaКМЦ Carboxy-methyl-cellulose sodium	ПВП 10000 Polyvinyl-pyrrolidon 10000	ПВС Polyvinyl alcohol
1	0,1	3,5	0,5	0,5	–	0,33	0,2
2	0,1	3,5	0,5	1,0	–	0,33	0,2
3	0,1	3,5	0,5	0,5	0,6	–	0,2
4	0,1	3,5	0,5	1,0	0,6	–	0,2

Поскольку составы 3 и 4 не отвечали технологическим параметрам (наблюдалась адгезия), то их дальнейшие биофармацевтические исследования не проводились.

Технологические характеристики гранул определены с использованием фармакопейных методик: фракционный состав, насыпная плотность, сыпучесть, распадаемость, прочность на истирание.

Исследования содержания активных веществ проводили в соответствии с методикой реакции образования розоцианина [23]. Профиль высвобождения метионина и куркумина в биорелевантные среды изучен с использованием системы FaSSIF (fasted state simulation intestinal fluid) и FeSSIF (fed state simulation intestinal fluid), которые имитируют кишечный сок до и после еды соответственно и позволяют приблизить полученный результат *in vitro* к показателям *in vivo* [24] (таблица 2).

Таблица 2. Состав биорелевантных сред и pH

Table 2. Formulation of biorelevant media and pH

Состав, мМоль/л Composition, mMol/l	**FaSSIF** Fasted state simulation intestinal fluid	**FeSSIF** Fed state simulation intestinal fluid
Натрия таурохолат (Fluka, Германия) Sodium taurocholate (Fluka, Germany)	3	10
Лецитин (AppliChem, Испания) Lecitin (AppliChem, Spain)	0,21	2
Кислота малеиновая (Acros, Бельгия) Maleic acid (Acros, Belgium)	19,12	55,05
NaOH (АО «ЛенРеактив», Россия) Sodium hydroxide (JSC LenReactiv, Russia)	34,81	81,65
NaCl (АО «ЛенРеактив», Россия) Sodium chloride (JSC LenReactiv, Russia)	68,62	125,51
Глицерилмоноолеат (ООО НПП «Электрогазохим», Украина) Glyceryl monooleate (Electrogasochem Ltd. company, Ukraine)	–	5,00
Натрия олеат (CAS № 143-19-1, Sigma, Германия) Sodium oleate (CAS № 143-19-1, Sigma, Germany)	–	0,81
pH	6,51	5,81

У всех полученных экспериментальных образцов в расчете на одну желатиновую капсулу № 000 с массой содержимого 1,35 грамм составила метионина 0,1 г, жидкого экстракта корневищ куркумы – 3,5 мл (0,0847 г). Дозировка действующих веществ выбрана исходя из профиля безопасности, исключения передозировки метионина и экстракта куркумы, что соответствует требованиям ЕАЭС. Исследования по растворению проводили на аппарате «Вращающая корзинка» [прибор для теста «Растворение» DT-720 (ERWEKA GmbH, Германия)] в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15. Капсулу, содержащую гранулы, помещали в корзинку аппарата и добавляли половину объема биорелевантной среды – 500 мл (FaSSIF pH = 6,51) (доведенную до температуры 37 ± 0,5 °C), выдерживали 10 минут, добавляли вторую половину среды 500 мл и запускали аппарат, скорость вращения «корзинки» – 100 об/мин. Исследования проводили на 6 образцах капсул для каждого экспериментального образца. Время отбора проб составляло 15, 30, 45 и 60 минут после начала испытания. Объем пробы – 10 мл, после отбора пробы среду растворения восполняли в соответствующем объеме. То же самое проделывали со второй средой (FeSSIF pH = 5,81). Пробы фильтровали через бумажный фильтр «Белая лента», отбрасывая первую порцию фильтрата. Количественное содержание куркуминоидов определяли по методике образования комплексов розоцианина и измеряли УФ-спектр при длине волны 450 нм (экспериментально установленный максимум поглощения). Количественное содержание метионина проводили с помощью нингидриновой реакции и измеряли УФ-спектр при длине волны 560 нм. Для каждого исследования отдельно готовили раствор стандартного образца куркумина (≥ 98,0 %, CAS № 458-37-7, Supleco, Германия) и метионина (≥ 99 %, CAS № 59-51-8, Sigma-Aldrich, США). Стандартные и испытуемые растворы фильтровали через бумажный фильтр «Белая лента» (ООО «Мелиор», Россия). Для каждого исследования на спектрофотометре проводилось трехкратное измерение оптической плотности стандартного образца (в расчетах использовалось ее среднее значение). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью математического пакета Statistica 8.0. Стандартная обработка полученных данных включала расчет средних арифметических величин и ошибок средних. Статистически значимые отличия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты физических и технологических характеристик модельных образцов гранул представлены в таблице 3.

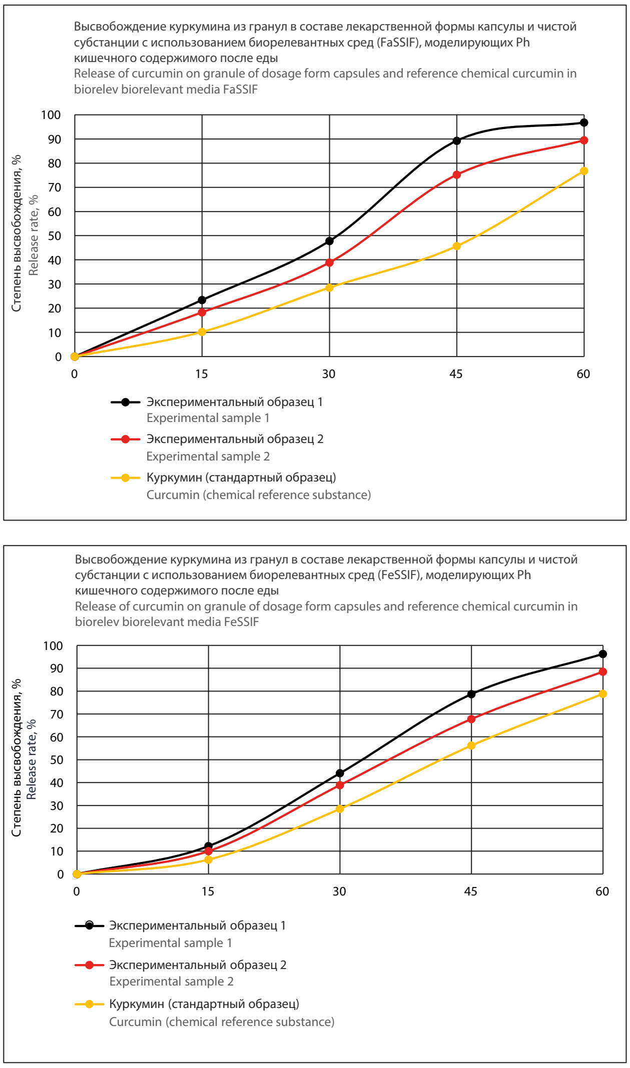
Нами была проанализирована кинетика высвобождения действующих веществ из твердой лекарственной формы, которая зависит от используемых вспомогательных веществ: формообразователей, разрыхлителей, увлажнителей. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV издания количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения в течение 45 мин, должно составлять не менее 75 % от заявленного содержания (ГФ XIV ОФС.1.4.2.0014.15).

Для выбора оптимального состава экспериментальных образцов капсул, содержащих гранулы метионина и экстракта корневищ куркумы длинной, были изготовлены и исследованы составы с различным количеством и набором вспомогательных веществ. Результаты биофармацевтического исследования экспериментальных капсул, содержащих гранулы, представлены на рисунках 1 и 2.

Таблица 3. Физические и технологические характеристики экспериментальных образцов гранул с метионином и жидким экстрактом корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.)

Table 3. Physical and technological characteristics of experimental samples of granules containing methionine and liquid extract of turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L.)

№ образца № sample	Рабочая фракция, мм Effective size fraction, mm	Насыпная плотность, кг/м^3 Tapped density, kg/m^3	Сыпучесть, г/с Flow, g/s	Распадаемость, мин Disintegration capacity, min	Прочность на истирание, % Friability, %	Влажность, % Moisture, %
1	0,5–1,0	298,32 ± 0,95 Легкие Light	7,65 ± 0,77 Хорошая Good	5,0 ± 1,0	81,64 ± 2,94	2,6 ± 1,0
2	0,5–1,0	302,00 ± 0,55 Легкие Light	2,35 ± 0,52 Допустимая Acceptable	5,0 ± 1,0	93,64 ± 3,12	2,3 ± 1,0



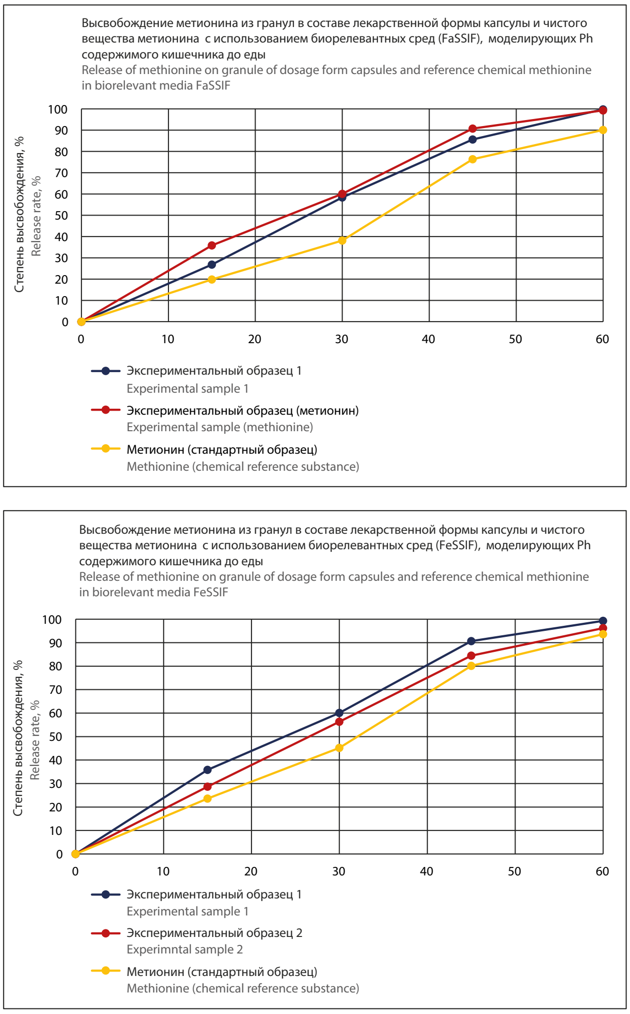


Рисунок 1. Высвобождение куркумина из гранул, заключенных в капсулы, и чистого вещества куркумина с использованием биорелевантных сред FaSSIF и FeSSIF

Figure 1. Release of curcumin from encapsulated granules and pure curcumin substance in biorelevant media FaSSIF and FeSSIF

Рисунок 2. Высвобождение метионина из гранул, заключенных в капсулы, и чистого вещества метионина с использованием биорелевантных сред FaSSIF и FeSSIF

Figure 2. Release of methionine from encapsulated granules and pure methionine substance in biorelevant media FaSSIF and FeSSIF

Анализируя полученные результаты, видно, что характер и степень высвобождения активных веществ – куркумина и метионина в исследуемых образцах достоверно отличаются между собой уже через 30 минут наблюдения. Результаты испытаний считали удовлетворительными, поскольку из полученных данных видно, что максимальное высвобождение куркумина и метионина наблюдается из модельного образца 1 в среде FeSSIF (при Ph = 6,5, слабо-кислая среда) и количество действующих веществ, перешедших в среду растворения, соответствовало ГФ XIV ОФС.1.4.2.0014.15.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных в экспериментальных биофармацевтических исследованиях *in vitro* результатов были определены составы модельной многокомпонентной гранулированной композиции в капсулах, отвечающих требованиям нормативной документации (ОФС.1.4.2.0014.15.). Среди исследуемых составов оптимальным является следующий: метионин 0,1; жидкий экстракт корневищ куркумы длинной 3,5 мл; крахмал 0,5; глюкоза 0,5; ПВП 5 % 0,06; ПВС 3 % 0,03. Предложенный состав композиции является оригинальным, не имеющим аналогов и защищенным патентом на изобретение (RU 268 4111) и может быть использован при производстве средств, нормализующих состояние факторов антиоксидантной защиты организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gibellini L., Bianchini E., de Biasi S., Nasi M., Cossarizza A., Pinti M. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:527209.
2. Sun D. J., Zhu L. J., Zhao Y. Q., Zhen Y. Q., Zhang L., Lin C. C., Chen L. X. Diarylheptanoid: A privileged structure in drug discovery. *Fitoterapia*. 2020;142:104490.
3. European Pharmacopeia/European Directorate for the quality of medicines and healthcare. 10th ed. Supplement 10.0. Strasbourg: Council of Europe; 2020. № 01/2015:2543.
4. Rainey N. E., Moustapha A., Patrice P. X. Curcumin, a Multifaceted Hormetic Agent, Mediates an Intricate Crosstalk between Mitochondrial Turnover, Autophagy, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020:1–23. DOI: 10.1155/2020/3656419.
5. Liu Y.-H., Lin Y.-S., Huang Y.-W., Fang S.-U., Lin S.-Y., Hou W.-C. Protective Effects of Minor Components of Curcuminoids on Hydrogen Peroxide-Treated Human HaCaT Keratinocytes. *J Agric Food Chem.* 2016;64(18):3598–3608. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01196.
6. Chainani-Wu N. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003;9(1):161–168. DOI: 10.1089/107555303321223035.
7. Kwiecien S., Magierowski M., Majka J., Ptak-Belowska A., Wojcik D., Sliwowski Z., Magierowska K., Brzozowski T. Curcumin: A Potent Protectant against Esophageal and Gastric Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1477. DOI: 10.3390/ijms20061477.
8. Liu Z., Huang P., Law S., Tian H., Leung W., Xu C. Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects. *Front Pharmacol.* 2018;9:1374. DOI: 10.3389/fphar.2018.01374.
9. Gupta S. C., Patchva S., Aggarwal B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013;15(1):195–218.
10. Soleimani V., Sahebkar A., Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytother Res.* 2018;32(6):985–995. DOI: 10.1002/ptr.6054.
11. Karewicz A., Bielska D., Gzyl-Malcher B., Kepczynski M., Lach R., Nowakowska M. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(1):231–239. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.06.037.
12. Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 2007;4(6):807–818. DOI: 10.1021/mp700113r.
13. Li L., Zhang X., Pi C., Yang H., Zheng X., Zhao L., Wei Y. Review of Curcumin Physicochemical Targeting Delivery System. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:9799–9821. DOI: 10.2147/IJN.S276201.
14. Dave P., Tiburu E., Nusair N., Lorigan G. Calculating order parameter profiles utilizing magnetically aligned phospholipid bilayers for H-2 solid-state NMR studies. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2003;24(2-3):137–149. DOI: 10.1016/S0926-2040(03)00052-3.
15. Hussain Z., Thu H. E., Ng S.-F., Khan S., Katas H. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: a review of new trends and state-of-the-art. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2017;150:223–241. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.036.
16. Mayol L., Serri C., Menale C., Crispi S., Piccolo M. T., Mita L., Giarra S., Forte M., Saija A., Biondi M., Mita D. G. Curcumin loaded PLGA-poloxamer blend nanoparticles induce cell cycle arrest in mesothelioma cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93:37–45. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.005.
17. Kaur G., Invally M., Chintamaneni M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin. *J. Complement Integr. Med.* 2016;13(3):247–255. DOI: 10.1515/jcim-2016-0016.
18. Корощенко Г. А., Суботялов М. А., Герасёв А. Д., Айзман Р. И. Влияние корневища растения *Curcuma longa* на углеводный обмен крыс в эксперименте. *Бюллетень СО РАМН.* 2011;31(3):92–96.
19. Lim J. M., Kim G., Levine R. L. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore. *Neurochem Res.* 2019;44(1):247–257. DOI: 10.1007/s11064-017-2460-0.
20. Фомина Е. В., Курский Ю. А., Белодед Л. Н., Червякова Г. Н. Синтез и свойства алифатических олигоамидов, содержащих метионин. *Журнал прикладной химии*. 2006;79(5):787–791.
21. Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. DOI: 10.1155/2014/360438.
22. Жилякова Е. Т., Цветкова З. Е., Новикова М. Ю., Кузьмичева О. А., Иванова Л. Л. Определение технологических характеристик субстанции метионина для разработки гранулированной лекарственной формы на его основе. *Молодой ученый.* 2016:19(123):152–155.
23. Гаврилин М. В., Орловская Т. В., Сенченко С. П. Содержание куркуминоидов в корневищах куркумы длинной. *Фармация.* 2010;3:30–32.
24. Волкова Е. А., Шохин И. Е., Раменская Г. В., Савченко А. Ю. Биорелевантные среды растворения – современный инструмент для моделирования процессов растворения и всасывания ЛС. *Биомедицина*. 2011;3:133–140.

REFERENCES

1. Gibellini L., Bianchini E., de Biasi S., Nasi M., Cossarizza A., Pinti M. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:527209.
2. Sun D. J., Zhu L. J., Zhao Y. Q., Zhen Y. Q., Zhang L., Lin C. C., Chen L. X. Diarylheptanoid: A privileged structure in drug discovery. *Fitoterapia*. 2020;142:104490.
3. European Pharmacopeia/European Directorate for the quality of medicines and healthcare. 10th ed. Supplement 10.0. Strasbourg: Council of Europe; 2020. № 01/2015:2543.
4. Rainey N. E., Moustapha A., Patrice P. X. Curcumin, a Multifaceted Hormetic Agent, Mediates an Intricate Crosstalk between Mitochondrial Turnover, Autophagy, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020:1–23. DOI: 10.1155/2020/3656419.
5. Liu Y.-H., Lin Y.-S., Huang Y.-W., Fang S.-U., Lin S.-Y., Hou W.-C. Protective Effects of Minor Components of Curcuminoids on Hydrogen Peroxide-Treated Human HaCaT Keratinocytes. *J Agric Food Chem.* 2016;64(18):3598–3608. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01196.
6. Chainani-Wu N. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003;9(1):161–168. DOI: 10.1089/107555303321223035.

7. Kwiecien S., Magierowski M., Majka J., Ptak-Belowska A., Wojcik D., Sliwowski Z., Magierowska K., Brzozowski T. Curcumin: A Potent Protectant against Esophageal and Gastric Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1477. DOI: 10.3390/ijms20061477.
8. Liu Z., Huang P., Law S., Tian H., Leung W., Xu C. Preventive Effect of Curcumin Against Chemotherapy-Induced Side-Effects. *Front Pharmacol.* 2018;9:1374. DOI: 10.3389/fphar.2018.01374.
9. Gupta S. C., Patchva S., Aggarwal B. B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013;15(1):195–218.
10. Soleimani V., Sahebkar A., Hosseinzadeh H. Turmeric (*Curcuma longa*) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. *Phytother Res.* 2018;32(6):985–995. DOI: 10.1002/ptr.6054.
11. Karewicz A., Bielska D., Gzyl-Malcher B., Kepczynski M., Lach R., Nowakowska M. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(1):231–239. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.06.037.
12. Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 2007;4(6):807–818. DOI: 10.1021/mp700113r.
13. Li L., Zhang X., Pi C., Yang H., Zheng X., Zhao L., Wei Y. Review of Curcumin Physicochemical Targeting Delivery System. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:9799-9821. DOI: 10.2147/IJN.S276201.
14. Dave P., Tiburu E., Nusair N., Lorigan G. Calculating order parameter profiles utilizing magnetically aligned phospholipid bilayers for H-2 solid-state NMR studies. *Solid State Nucl. Magn. Reson*. 2003;24(2-3):137–149. DOI: 10.1016/S0926-2040(03)00052-3.
15. Hussain Z., Thu H. E., Ng S.-F., Khan S., Katas H. Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: a review of new trends and state-of-the-art. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2017;150:223–241. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.036.
16. Mayol L., Serri C., Menale C., Crispi S., Piccolo M. T., Mita L., Giarra S., Forte M., Saija A., Biondi M., Mita D. G. Curcumin loaded PLGA-poloxamer blend nanoparticles induce cell cycle arrest in mesothelioma cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93:37–45. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.005.
17. Kaur G., Invally M., Chintamaneni M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin. *J. Complement Integr. Med.* 2016;13(3):247–255. DOI: 10.1515/jcim-2016-0016.
18. Koroshchenko G. A., Subotyalov M. A., Gerasev A. D., Aisman R. I. Influence of a rhizome of plant *Curcuma longa* on a carbohydrate balance in experiments on rats. *Byulleten' SO RAMN = The Siberian Scientific Medical Journal.* 2011;31(3):92–96. (In Russ.)
19. Lim J. M., Kim G., Levine R. L. Methionine in Proteins: It’s Not Just for Protein Initiation Anymore. *Neurochem Res.* 2019;44(1):247–257. DOI: 10.1007/s11064-017-2460-0.
20. Fomina E. V., Kurskii Yu. A., Beloded L. N., Chervyakova G. N. Synthesis and properties of aliphatic oligoamides containing methionine fragment. *Zhurnal prikladnoy khimii = Russian Journal of Applied Chemistry*. 2006;79(5):787–791. (In Russ.)
21. Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. DOI: 10.1155/2014/360438.
22. Zhilyakova E. T., Tsvetkova Z. E., Novikova M. Yu., Kuz'micheva O. A., Ivanova L. L. *Opredelenie tekhnologicheskikh kharakteristik substantsii metionina dlya razrabotki granulirovannoy lekarstvennoy formy na ego osnove* [Determination of the technological characteristics of methionine for the development of a granular dosage form based on it]. *Molodoy ucheniy.* 2016:19(123):152-155. (In Russ.)
23. Gavrilin M. V., Orlovskaya T. V., Senchenko S. P. Contents of curcuminoids in turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2010;3:30–32. (In Russ.)
24. Volkova E. A., Shohin I. E., Ramenskaya G. V., Savchenko A. U. Biorelevant dissolution media – modern tool for modelling of drugs dissolution and absorbtion. *Biomeditsina = Journal Biomed.* 2011;3:133–140. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-50-61
УДК 615.453.4.014.6

Обзорная статья / Review article

Современные исследования в области микрокапсулирования (обзор)

Ю. А. Полковникова*, Н. А. Ковалёва

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»), 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, д. 1

***Контактное лицо:** Полковникова Юлия Александровна. **E-mail:** juli-polk@mail.ru

ORCID: Ю. А. Полковникова – https://orcid.org/0000-0003-0123-9526; Н. А. Ковалёва – https://orcid.org/ 0000-0002-3507-5665.

Статья поступила: 17.12.2020 **Статья принята в печать:** 01.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Микрокапсулирование – одно из перспективных направлений получения новых лекарственных форм. Особенность микрокапсулированных форм заключается в том, что вещество защищено от воздействия различных факторов окружающей среды, которые могут вызвать их разрушение (кислотность желудочного сока, влияние пищи, совместный прием других препаратов, заболевания желудочно-кишечного тракта и т. п.). Данный метод применяется для различных групп препаратов, таких как антибиотики, ноотропы, витамины, пробиотики, противосудорожные препараты, ферменты. Особое внимание следует уделить антибактериальным препаратам, так как возможность микрокапсулирования решает одну из важнейших проблем терапии антибиотиками – резистентность микроорганизмов.

Текст. Цель обзора – анализ современных исследований в области микрокапсулирования, изучение тенденций и направлений по созданию микрокапсул с высокой активностью и биодоступностью и с минимальными побочными эффектами. В статье приводятся краткие сведения и основные выводы по разработке методик и подбору условий для микрокапсулирования индивидуальных лекарственных веществ, по изучению полимеров различной природы для использования в качестве носителей, по способам формирования двойных оболочек микрокапсул, а также исследована эффективность микрокапсулирования биологически активных веществ, таких как антибактериальные препараты, вещества растительного и животного происхождения, и препаратов из различных фармакологических групп. Приведены варианты методик микрокапсулирования для конкретных соединений, которые подходят для сходных по составу и действию веществ, а также способы создания микрокапсул с двойными оболочками для нерастворимых в воде соединений.

Заключение. В статье показаны достижения и перспективы использования микрокапсулирования лекарственных веществ и их преимущества перед стандартными лекарственными формами. Активное внедрение разработанных методик в производство позволит создать новые лекарственные формы с известными лекарственными веществами, обладающими пролонгированным действием, что позволит сократить кратность применения препарата, а также сохраняющими свою активность под влиянием негативных факторов внутренней среды организма. Также в форме микрокапсул вещества проявляют большую активность в сравнении с незакапсулированными веществами.

Ключевые слова: микрокапсулирование, полимер, пролонгированная лекарственная форма, антибактериальные препараты, ферменты, двойная оболочка, двойные эмульсии, биодоступность, высвобождение

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Ю. А. Полковникова осуществила обзор публикаций, написание текста рукописи, проверку конечной версии рукописи и перевод. Н. А. Ковалёва сделала обзор публикаций, оформление рукописи.

Для цитирования: Полковникова Ю. А., Ковалёва Н. А. Современные исследования в области микрокапсулирования. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):50–61. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-50-61

Modern Research in the Field of Microencapsulation (Review)

Yulia A. Polkovnikova*, Nalalia A. Kovaleva

Voronezh State University, 1, University sq., Voronezh, 39401, Russia

***Corresponding author:** Yulia A. Polkovnikova. **E-mail:** juli-polk@mail.ru

ORCID: Yulia A. Polkovnikova – https://orcid.org/0000-0003-0123-9526; Nalalia A. Kovaleva – https://orcid.org/ 0000-0002-3507-5665.

Received: 17.12.2020 **Revised:** 01.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Microencapsulation is one of the promising areas for obtaining new dosage forms. The peculiarity of microencapsulated forms is that the substance is protected from the effects of various environmental factors that can cause their destruction (acidity of gastric juice, the effect of food, joint intake of other drugs, diseases of the gastrointestinal tract, etc.). This method is used for various groups of drugs, such as antibiotics, nootropics, vitamins, probiotics, anticonvulsants, enzymes. Particular attention should be paid to antibacterial drugs, since the possibility of microencapsulation solves one of the most important problems in antibiotic therapy – the resistance of microorganisms.

Text. The purpose of the review is to analyze modern research in the field of microencapsulation, to study trends and directions for the creation of microcapsules with high activity and bioavailability and with minimal side effects. The article provides brief information and main conclusions on the development of techniques and selection of conditions for microencapsulation of individual medicinal substances, on the study of polymers of various natures for use as carriers, on the methods of forming double shells of microcapsules, and also investigated the efficiency of microencapsulation of biologically active substances, such as antibacterial preparations, substances of plant and animal origin and preparations from various pharmacological groups. Variants of microencapsulation techniques for specific compounds that are suitable for substances similar in composition and action, as well as methods for creating microcapsules with double shells for compounds insoluble in water, are presented.

Conclusion. The article shows the achievements and prospects of using microencapsulation of medicinal substances and their advantages over standard dosage forms. The active introduction of the developed methods into production will allow the creation of new dosage forms with known medicinal substances that have a prolonged effect, which will reduce the frequency of use of the drug, as well as retain their activity under the influence of negative factors of the internal environment of the body. Also, in the form of microcapsules, the substances are more active in comparison with non-encapsulated substances.

Keywords: microencapsulation, polymer, prolonged dosage form, antibacterial drugs, enzymes, double shell, double emulsions, bioavailability, release

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Yulia A. Polkovnikova carried out a review of publications, writing the text of the manuscript, checking the final version of the manuscript and translating. Nalalia A. Kovaleva reviewed publications, manuscript design.

For citation: Polkovnikova Yu. A., Kovaleva N. A. Modern research in the field of microencapsulation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):50–61. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-50-61

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы микрокапсулирование активных фармацевтических субстанций (АФС) активно изучается. Проводится большое количество исследований, посвященных выбору условий микрокапсулирования для конкретных АФС, особенностям фармакологического действия инкапсулированных лекарственных препаратов, их высвобождению и биодоступности, подбору полимеров для микрокапсулирования и их влиянию на вещество, разработке методик инкапсулирования АФС, проведению качественного и количественного анализа микрокапсул.

Особенность микрокапсулированных форм заключается в том, что вещество защищено от воздействия различных факторов окружающей среды, которые могут вызвать их разрушение (кислотность желудочного сока, влияние пищи, совместный прием других препаратов, заболевания желудочно-кишечного тракта и т. п.). В такой форме лекарственный препарат достигает органа-мишени с максимальной биодоступностью.

Данный метод применяется для различных групп препаратов, таких как антибиотики, ноотропы, витамины, пробиотики, противосудорожные препараты, ферменты и ряд других.

УСЛОВИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКАПСУЛ

К каждому объекту, в зависимости от его физико-химических свойств, необходимо подбирать соответствующие условия получения микрокапсул [1].

Одной из первых технологий получения микрокапсул является коацервация, или фазовое разделение. Коацервация представляет собой процесс образования в растворе высокомолекулярных соединений, обогащенных растворенным веществом. В качестве примера коацервации можно привести получение микрокапсул токоферола ацетата. Полимерами служат водорастворимые соединения – смесь желатина и аравийской камеди. В уксуснокислой среде желатин приобретает положительный заряд и взаимодействует с аравийской камедью с образованием полиэлектролитного коацерватного комплекса. При медленном охлаждении вводят белый уголь и проводят обезвоживание изопропиловым спиртом, сушат. Получаются микрокапсулы с диаметром частиц 100–200 мкм.

На основе микрокапсул возможно производство таких лекарственных форм, как таблетки, суспензии, подкожные имплантаты [2].

ТИПЫ ПОЛИМЕРОВ-НОСИТЕЛЕЙ

Большая роль отводится выбору полимера для микрокапсулирования. В качестве оболочки нередко используется альгинат натрия – водорастворимый и биодеградируемый полимер. Его часто применяют в качестве антацидного средства, а также как загуститель в пищевой промышленности. Проведено исследование микрокапсулирования АФС в альгинат натрия. В основе процесса лежит образование оболочек вокруг образующихся микрокапсул при введении альгината натрия в соли кальция и образование ионно-сшитых микрогелей альгината кальция (рисунок 1).

Использовались такие ЛВ, как акридон, фурацилин, тетрациклин, дибазол и метронидазол. Наилучшие результаты микрокапсулирования акридона были получены ультразвуковым диспергированием смеси, что позволило сократить время получения микрокапсул, увеличить количество получаемых микрокапсул, а также улучшить физико-химические характеристики микрокапсулируемого вещества. Анализ влияния природы растворителя показал, что при использовании этанола выход продукта больше, чем при использовании ацетона. Для микрокапсулирования остальных веществ применен метод с использованием магнитной мешалки, так как при применении

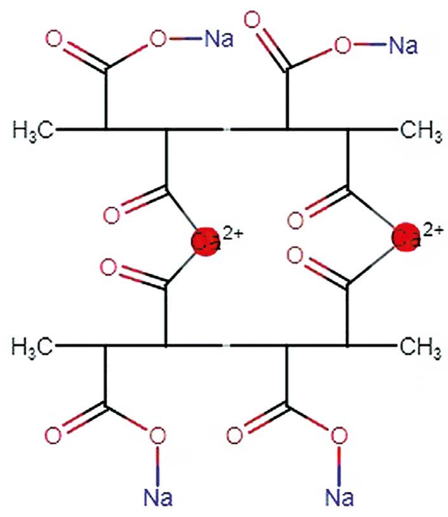


Рисунок 1. Ионно-сшитые микрогели альгината кальция

Figure 1. Ion-crosslinked calcium alginate microgels

ультразвукового диспергатора происходил перегрев реакционной смеси и коагулирование тонкой дисперсии. Результаты исследования свидетельствуют о том, что для каждого инкапсулированного вещества необходимо подбирать индивидуальные условия проведения процесса. Исследовано влияние pH на процесс седиментации фурацилина. С увеличением pH среды устойчивость водных дисперсий микрокапсул увеличивается [3].

Помимо альгината натрия в качестве оболочки используют поливиниловый спирт (ПВС) и поливинилпирролидон (ПВП). Это водорастворимые полимеры, используемые для микрокапсулирования нерастворимых в воде соединений, таких как, например, антибактериальные лекарственные препараты. В водорастворимой форме повышается степень их биодоступности. Методом осаждения полимера на поверхности вещества путем замены растворителя получены микрокапсулы производного акридона – 4-карбоксиакридона, обладающего антибактериальной, противовирусной и противоопухолевой активностью. Методом ИК-спектроскопии установлено, что вещество находится внутри капсулы и отсутствует на поверхности. При анализе антимикробной активности микрокапсул 4-карбоксиакридона доказано, что активность инкапсулированного вещества не отличается от активности исходного. Проведенное исследование подтверждает, что оболочки из ПВС и ПВП не снижают активность инкапсулированного АФС, а полное включение его внутрь полимера защищает от воздействия вредных факторов внутренней среды организма [4].

Также широко используются для микрокапсулирования водонерастворимые полусинтетические полимеры – эфиры целлюлозы, такие как ацетилцеллюлоза, этилцеллюлоза и нитроцеллюлоза. Разработаны методики инкапсулирования АФС с их использованием. Примером данного процесса является микрокапсулирование акридинуксусной кислоты, обладающей противовирусным, иммуностимулирующим и противовоспалительным действием. Микрокапсулы получены физико-химическим методом с переосаждением полимера на поверхности АФС путем замены растворителя. В качестве осадителя использован водный раствор ацетона, в котором осаждение происходит не так активно и на поверхности формируется плотная оболочка полимера. Методом ИК-спектроскопии установлено, что на поверхности оболочки отсутствуют частицы инкапсулированного вещества. Методом тонкослойной хроматографии подтверждено наличие АФС в микрокапсулах. Для количественного определения применяется УФ-спектрофотометрия. Наибольшим выходом характеризуются микрокапсулы нитроцеллюлозы [5].

СОЗДАНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Микрокапсуляция клеток животных позволяет не только снижать иммуногенность, но и предотвращать миграцию инкапсулированных клеток. Чаще всего для микрокапсулирования таких клеток используются альгинатные/поли-L-лизиновые микросферы [6].

Клетки помещают в раствор альгината натрия и с помощью раствора хлорида кальция получают микрокапсулы за счет образования ионно-сшитого комплекса. Полученные микрокапсулы помещают в раствор поли-L-лизина, образующий их внешнюю оболочку. В основе лежит взаимодействие между положительно заряженными аминогруппами поли-L-лизина и свободными отрицательно заряженными карбоксильными группами альгината. Толщина оболочки регулируется концентрацией поли-L-лизина. Полученные микрокапсулы необходимо выдержать в растворе альгината натрия для нейтрализации свободных положительно заряженных аминогрупп поли-L-лизина.

При лечении гипотиреоза основным методом является пероральное введение гормонов щитовидной железы. Данный метод имеет ряд недостатков, в том числе низкую биодоступность и побочные эффекты. Проведено исследование по микрокапсулированию клеток щитовидной железы свиньи в качестве метода замещения тиреоидных гормонов. Полимер, в который заключена ткань, предотвращает проникновение антител, что позволяет проводить имплантацию органоидов с клетками щитовидной железы. Это даст возможность отказаться от иммуносупрессии пациентов. Клетки щитовидной железы свиней выделяли и инкапсулировали в альгинат-поли-L-орнитин-альгинатные микрокапсулы с помощью микрофлюидного устройства. Принцип метода описан выше на примере альгинат-поли-L-лизин-альгинатных микрокапсул. Результаты исследования показали, что высвобождение тироксина из инкапсулированных клеток было выше, чем из неинкапсулированных ($P < 0,05$), и сохранялось на протяжении всего эксперимента (>28 дней). Эти результаты позволяют предположить, что микрокапсулированные органоиды клеток щитовидной железы могут иметь потенциал для использования в терапии и/или скрининге лекарств [7].

Преодоление иммуногенности и отказ от применения иммуносупрессоров при микрокапсулировании тканей доказано в исследовании иммуноизоляции хондроцитами ушного хряща (CMI-islet) тканей островков поджелудочной железы крыс. Полученные микрокапсулы подвергались воздействию глюкозы. Исследование показало, что клетки способны выделять достаточное количество инсулина в соответствии с концентрацией глюкозы. В сравнении с обнаженными островками, они реагировали лучше. Секреция инсулина была подтверждена в течение 100 дней, что свидетельствует о выживаемости и секреторной активности.

Микрокапсулируя панкреатические островки с клетками реципиентного ушного хряща, можно поддерживать долгосрочную секрецию инсулина и улучшать реакцию на проблемы с глюкозой. Эта новая технология иммуноделюции отличается от других методов иммуноизоляции тем, что донорская ткань заключена в ткань реципиента, что позволяет трансплантированным клеткам быть распознанными как клетки реципиента. Этот метод микроинкапсуляции может привести к разработке жизнеспособных методов ксенотрансплантации, которые не используют иммуносупрессивные средства [8].

В одном из исследований получены микрокапсулы альбумина с лизоцимом. Цель микрокапсулирования – снижение иммуногенности. Для получения микрокапсул раствор альбумина химически сшивали с глутаровым диальдегидом, а затем добавляли АФС-лизоцим. Для предотвращения сшивки АФС с альбуминовой матрицей избыток глутарового диальдегида нейтрализовали бисульфитом натрия. Процесс заканчивался распылительной сушкой. Оценка биоактивности подтвердила, что лизоцим сохранил свои свойства и активность. В ходе исследований *in vivo* выявлено отсутствие повышения уровня антигенспецифического сывороточного IgG, что свидетельствует о безопасности и биосовместимости сшитого альбуминового матрикса [9].

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДАМИ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ

Микрокапсулирование применяется не только для АФС, но и для различных ферментов. Проведено исследование по иммобилизации тиаминкиназы из печени свиньи. В результате исследования установлено, что иммобилизация фермента в гидрофобный носитель на основе бутадиенового каучука повышает ее стабильность и термоустойчивость. Гидрофильная оболочка из нитрата целлюлозы за счет нитрогруппы с отрицательным зарядом сосредотачивает около себя положительно заряженные молекулы тиамина и катионы магния, что снижает их содержание вокруг каталитического центра фермента и, следовательно, активность. Поэтому для микрокапсулирования возможно использовать гидрофобный носитель тиаминкиназы в качестве препарата с пролонгированным действием [10].

Также проведено исследование по инкапсулированию пепсина в 10%-й раствор мальтодекстрина. Для проведения микрокапсулирования ферментов был разработан специальный аппарат, в котором проводили струйное диспергирование. Данный аппарат отличался от ранее разработанных тем, что за счет диффузии мальтодекстрина в фермент обеспечивается его высокая длительная активность. У полученных с помощью этого аппарата микрокапсул были оценены протеолитические свойства и активность. Анализ результатов исследований показал, что чем толще слой мальтодекстрина, тем дольше сохраняется его первоначальная активность. Подтверждено, что мальтодекстрин обеспечил высокую твердость стенок капсулы, что позволяет использовать только это вещество в качестве эффективного капсулирующего материала без дополнительных добавок [11].

Трансглутаминаза (ТГ) – важный фермент, повышающий твердость, вязкость и водосвязывающую способность за счет катализа реакции сшивания белков. Получение микрокапсулированной формы ТГ позволяет сохранить активность фермента на длительное время. В исследовании фермент ТГ микрокапсулирован с использованием сублимационной сушки. Покрытие – манит, гуммиарабик и казеин. Оптимальные условия: скорость гомогенизации – 11 200 об/мин, время гомогенизации – 1,27 мин, смесь маннита, гуммиарабика и казеина в соотношении 38,2, 40,2 и 21,6 % соответственно. Остаточную активность микрокапсулированного фермента ТГ определяли методом фотоколориметрии. Она составила 93 %, а фермента без покрытия – 64 % при тех же условиях. Поскольку данный параметр является важной характеристикой фермента, можно сделать вывод, что применение сублимационной сушки способствует сохранению активности ТГ [12].

МИКРОКАПСУЛЫ – НОВАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ИЗВЕСТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Создание микрокапсулированных форм применяется для ноотропных АФС. Помимо подбора условий процесса осуществляется комплексный анализ полученного продукта. В этой области проведено комплексное исследование альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином. Методом экструзии получены микрокапсулы с использованием в качестве полимера альгината натрия различной концентрации, а также раствор хитозана средней вязкости. Сшивание альгинатного комплекса проводилось раствором кальция хлорида по механизму, описанному выше. Далее микрокапсулы помещали в раствор хитозана, где молекулы образовывали полиэлектролитный альгинат-хитозановый комплекс за счет взаимодействия между аминогруппами хитозана и свободными, не связанными ионами кальция, карбоксильными группами альгината натрия. Комплексообразование происходит по механизму электростатического взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами. Методом атомно-силовой микроскопии проведено сравнение микрокапсул, имеющих хитозановую оболочку и без нее. В результате установлено, что поверхность частиц имеет характерные отличия с увеличением концентрации альгината натрия (рисунок 2).

Методом спектрофотометрии определено, что эффективность микрокапсулирования максимальна при концентрации альгината натрия 2,5 % (86,8 %) (рисунок 3).

При этом наибольшая степень высвобождения винпоцетина отмечена у образцов с концентрацией альгината натрия 1 % (41,17 %), но при концентрации 2,5 % отмечается постепенное высвобождение АФС, что позволяет использовать данные микрокапсулы для получения пролонгированных лекарственных препаратов.

В результате комплексных исследований установлено, что микрокапсулы можно использовать для получения капсульных лекарственных форм [13].

Методы микрокапсулирования используются для создания лекарсатвенных препаратов пролонгированного действия. Исследование поводили на примере модельных соединений – *о*-крезоксуксусной и акридонуксусной кислот, – оказывающих иммуностимулирущее и противовирусное действие. Оболочка – полимер Eudragit® L100, представляющий собой катионный сополимер метакриловой кислоты и метилметакрилата (1:1). Изучение кинетики высвобождения АФС из микрокапсул проводили спектрофотометрическим методом. Установлено, что наиболее длительное время высвобождения наблюдается при использовании в качестве наполнителя натрий карбоксиметилцеллюлозы (192 ч) и гуаровой камеди (168 ч). Данное исследование подтверждает возможность создания лекарственных препаратов пролонгированного действия с использованием данных полимеров [14].

Разработано получение микрокапсул урсодезоксихолевой кислоты (УДХК). Цель исследования – разработка микрокапсул УДХК для перорального применения с целью использования у больных сахарным диабетом 1 типа. УДХК для микрокапсулирования брали в виде суспензии в концентрации 1 мг/мл. В качестве матрицы использовался 2%-й раствор альгината натрия. Ионное сшивание проводили 2%-м раствором кальция хлорида. Полученные микрокапсулы испытывали на 3 равных группах мышей: 1-я получала УДХК; 2-я – пустые микрокапсулы; 3-я – микрокапсулы УДХК. Эксперимент показал, что микрокапсулы УДХК приводили к снижению повышенного уровня глюкозы в крови, уменьшению воспаления и изменению концентрации первичной и вторичной желчной кислоты. УДХК оказывает прямое защитное действие на β-клетки поджелудочной железы [15].

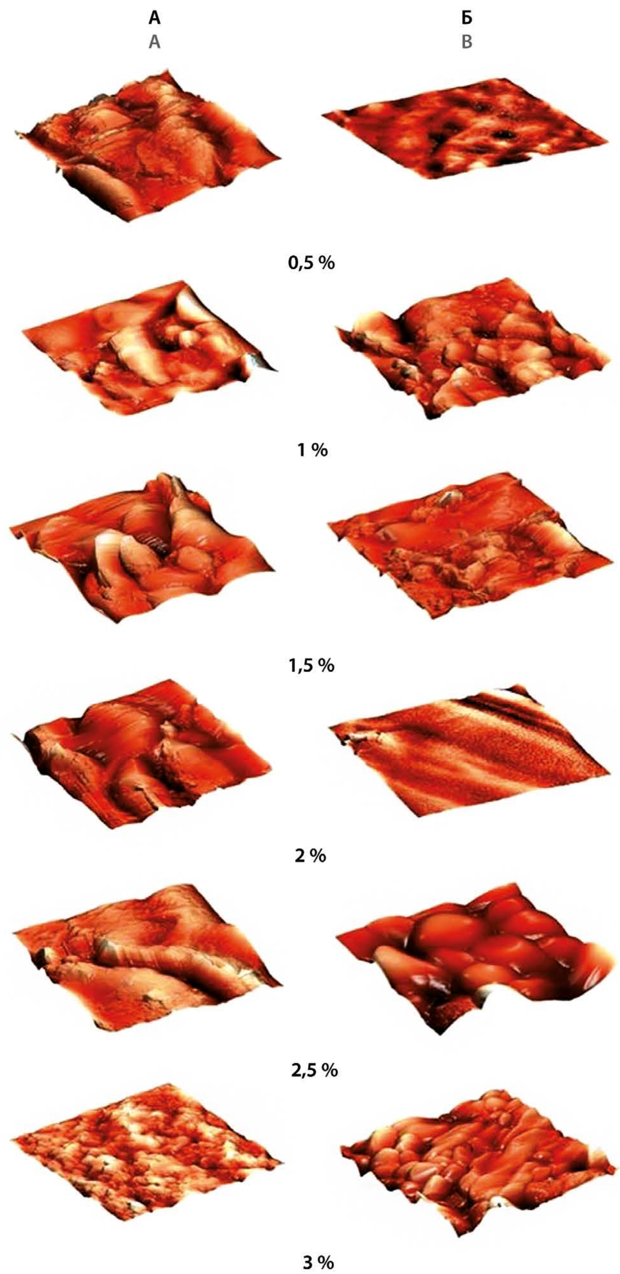


Рисунок 2. Трехмерные АСМ-изображения поверхности микрокапсул с различными концентрациями альгината натрия, обработанных раствором хитозана (А) и без хитозана (Б) при площади сканирования 5 × 5 мкм²
Figure 2. Three-dimensional AFM images of the surface of microcapsules with different concentrations of sodium alginate treated with a solution of chitosan (A) and without chitosan (B) at a scanning area of 5 × 5 microns²

Также проведены исследования по микрокапсулированию дутастерида – препарата для лечения заболеваний предстательной железы. Полимером явля-

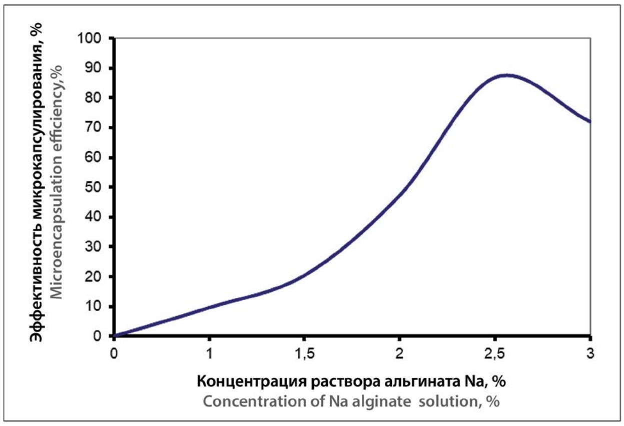


Рисунок 3. **Зависимость эффективности микрокапсулирования от концентрации альгината натрия**

Figure 3. **Dependence of the microcapsulation efficiency on the concentration of sodium alginate**

лась этилцеллюлоза в соотношении с препаратом 1:1, 1:3 и 1:5. АФС и этилцеллюлозу растворяли в дихлорметане, а затем эмульгировали в водном растворе поливинилового спирта (ПВС) с целью получения однородных по размеру микрокапсул. Размер полученных микрокапсул составлял 95–119 мкм с хорошей эффективностью и высвобождением. Методом Фурье-спектроскопии установлено, что между АФС и полимером образовалась водородная связь. Данный тип взаимодействия повышает растворимость гидрофобных молекул дудастерида, что, в свою очередь, повышает его высвобождение и биодоступность. Принимая в расчет физико-химические свойства и молекулярные взаимодействия веществ, можно получать микрокапсулы с заданными свойствами и интенсивностью высвобождения [16].

Заключение веществ в микрокапсулы позволяет не только повысить биодоступность и снизить вероятность развития побочных эффектов, но и маскировать неприятный вкус препаратов. Ярким примером служит инкапсуляция противоаллергического препарата – цетиризина дигидрохлорида – в наночастицы хитозана. Для получения микрокапсул использовали метод ионотропного гелеобразования с последующей распылительной сушкой. Хитозан в концентрации 0,5–2,0 % получали путем его растворения в разведенной уксусной кислоте. В полученном растворе производили растворение АФС с использованием магнитной мешалки до получения однородной смеси. Для образования ионного геля к смеси добавляли триполифосфат натрия. Образование микрокапсул происходит в результате взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп триполифосфата натрия и положительно заряженных аминогрупп цетиризина. Полученные микрокапсулы имели гладкую поверхность и диаметр 0,5–5 мкм. Методом ВЭЖХ установлено, что эффективность инкапсулированной АФС составляет около 70 % независимо от концентрации цетиризина и соотношения АФС/полимер. Для определения степени высвобождения микрокапсулы высушивали распылительной сушкой, помещали на мембрану с размером пор 8 кДа в среду фосфатного буфера и инкубировали при 37 ± 0,5 °C в течение 12 часов. Далее методом ВЭЖХ отмечен высокий уровень высвобождения вещества в течение первых двух часов, а затем замедление и плавный выход оставшегося компонента. Данная методика применима для АФС, имеющих хорошую растворимость в воде, так как для процесса микрокапсуляции используется водный раствор хитозана и вещество должно в нем раствориться [17].

МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Проводятся исследования возможности микрокапсулирования пробиотиков. Для этого использовался кишечнорастворимый сополимер Eudragit® L100 и препарат, содержащий штаммы пробиотических микроорганизмов: *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis*. Микрокапсулы получены физико-химическим методом переосаждения полимера на поверхность инкапсулируемого вещества путем замены растворителя. Наполнитель – Полисорб® и масляная основа. В результате качественного анализа микрокапсул установлено наличие азотсодержащих соединений, что доказывает наличие белка. Исследование подтвердило возможность использования сополимера Eudragit® L100 для микрокапсулирования пробиотиков [18].

Микрокапсулирование пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* проводится в биокомпозите, состоящем из натрия альгината, пектина и желатина (1,06, 0,55 и 0,39 % соответственно). Полученные микрокапсулы показали большую выживаемость бактерий на 88,66 % по сравнению с некапсулированными бактериями. Далее проанализированы микрокапсулы, содержащие пробиотик и жирную кислоту – докозагексаеновая кислота (ДГК). Результаты подтвердили, что бактерии полностью захвачены матрицей, а ДГК увеличила гладкость поверхности частиц. Методом Фурье-спектроскопии установлено, что между ядром из альгинат-пектин-желатинового комплекса и ДГК образованы водородные связи. Это позволило обеспечить термическую стабильность таких микрокапсул по сравнению с бактериями, не заключенными в микрокапсулы [19].

МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Микрокапсулирование активно применяется для антибактериальных препаратов. Поскольку антибиотики необходимо принимать несколько раз в сутки (перорально и/или парентерально), а также они имеют, как правило, невысокую биодоступность, помещение этих веществ в микрокапсулы позволит решить подобные проблемы. В этой области проведено исследование процесса микрокапсулирования таких антибактериальных препаратов, как окситетрациклин и цефтриаксон, в двойные оболочки, включающие два вида полимера: водорастворимый (альгинат натрия, поливиниловый спирт и поливинилпирролидон) – внешняя оболочка и водонерастворимый (ацетилцеллюлоза) – внутренняя оболочка. Использование внутренней водонерастворимой оболочки позволяет обеспечить разную скорость высвобождения АФС, варьируя размеры микрокапсулы. Внешняя водорастворимая оболочка, защищая от воздействия негативных факторов, повышает биодоступность АФС. В суспензию антибиотика вводили ацетоновый раствор ацетилцеллюлозы и осуществляли осаждение на поверхности АФС за счет постепенного прибавления дистиллированной воды (замена растворителя). Далее создавали вторую оболочку путем прибавления водного раствора альгината натрия или ПВС (ПВП), добавляя насыщенный раствор натрия хлорида (для достижения полноты осаждения).

Методом ИК-спектроскопии установлено наличие всех компонентов в микрокапсулах, а также подтверждено послойное нанесение полимеров на АФС. Выход антибиотиков из микрокапсул с ПВС и альгинатом натрия выше, чем с ПВП (соотношение 1:1:1). Использование двойных оболочек обеспечит пролонгированное действие препарата и создание оптимальной терапевтической концентрации лекарственного вещества в крови [20].

В настоящее время наблюдается тенденция к устойчивости бактерий к применяющимся антибактериальным препаратам. В связи с этим одним из методов лечения инфекционных заболеваний является фаготерапия. Разработана микрокапсулированная форма бактериофага на модели клебсиеллезного бактериофага. Бактериофаг предварительно концентрировали в 100 раз методом мембранной ультрафильтрации. В качестве носителя использовали натрия альгинат. Получение микрокапсул осуществляли несколькими способами. В первом случае в вазелиновое масло (дисперсионная среда) вливали гидрогель с бактериофагом на основе альгината натрия в концентрации от 0,25 до 3 %, который диспергировался на капли различного размера. С помощью кальция хлорида проводили сшивку, и оболочка затвердевала. Полученные микрокапсулы имели размер от 26 до 300 мкм. Во втором случае микрокапсулирование проводили аналогично, но без использования альгината натрия. Размер микрокапсул составил от 66 до 1250 мкм. Использование второй методики нецелесообразно, так как такие микрокапсулы имели неправильную форму, обладали неудовлетворительными технологическими характеристиками (сыпучесть, однородность дозирования). Оптимальными технологическими характеристиками обладают микрокапсулы, полученные на полимерном носителе с концентрацией от 1,0 до 2,0 %. Далее проводился подбор стабилизирующих веществ для бактериофага. Наилучшая стабильность наблюдалась в присутствии сахаров – сорбита, лактозы, маннита и метилцеллюлозы. Следующий этап – подбор вида и режима сушки. Экспериментально установлено, что наиболее оптимальной является вакуумная сушка однократным высушиванием при средней глубине вакуума. Стандартизацию проводили по показателям: внешний вид, влагосодержание, средняя масса и отклонение от средней массы, диаметр, литическая активность. Оценку фармакологической биодоступности разработанных микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом проводили *in vitro* в мерном стакане с магнитной мешалкой для жидкого клебсиеллезного бактериофага и в лабораторном индентификаторе процесса распадаемости для микрокапсулированного препарата. Исследования показали, что микрокапсулы с бактериофагом после воздействия кислой среды имеют большую биодоступность, чем бактериофаг в жидкой лекарственной форме. Создание микрокапсулированной формы бактериофага с кишечнорастворимой оболочкой позволяет использовать его для получения комплексных препаратов или в качестве самостоятельного лекарственного препарата [21].

В настоящее время фаготерапия выступает как одно из альтернативных решений проблем, возникающих в связи с устойчивостью патогенных бактерий к антибиотикам. Хотя фаготерапия успешно применяется как *in vitro*, так и *in vivo*, одной из самых больших проблем в этом отношении является стабильность фагов в среде организма. В рамках данного исследования была использована технология микрокапсулирования для повышения устойчивости фагов к физиологическим условиям, а полученные микрокапсулы были испытаны в средах, имитирующих условия организма. Для этой цели используют *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica subsp.* Фаги *Enterica serovar Typhimurium (Salmonella Typhimurium)* выделяли из различных источников и затем микрокапсулировали в 1,33%-й раствор альгината натрия с помощью распылительной сушки для минимизации повреждения физиологической среды. Исследована стабильность микрокапсул в моделируемой желудочной жидкости и среде желчных солей. Для изучения стабильности в среде желудка готовили раствор, состоящий из 0,2%-го раствора натрия хлорида и пепсина, с pH 2,4, добавляли в него микрокапсулы и инкубировали при температуре 37 °C. Отбор проб осуществляли на 0, 15, 30, 60 и 90-й минуте инкубирования. Титры фагов определяли методом двухслойного агара. Выявленное максимальное снижение титра инкапсулированных фагов после двухчасовой инкубации составило 2,29 логарифмической единицы для фага *B. subtilis*, 1,71 логарифмической единицы для фагов *S. Enteritidis* и 0,60 логарифмической единицы для фагов *S. Typhimurium,* в то время как свободные фаги теряли свою жизнеспособность даже после 15-минутной инкубации. Для исследования стабильности в среде желчных солей микрокапсулы помещали в 2%-й желчный экстракт и инкубировали при 37 °C. Отбор проб осуществляли в первый и третий час инкубации. Титр определяли аналогично среде желудка. Обнаружено, что микрокапсулирование повышает стабильность фагов в среде желчных солей – после трех часов инкубации разница между титрами микрокапсулированных фагов и свободных фагов может достигать до трех логарифмических единиц [22].

Опубликовано исследование, посвященное получению микрочастиц, содержащих рифампицин, с использованием полимера поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) для перорального введения. Выбор данного полимера обусловлен его хорошей биосовместимостью и биодеградабельностью. Микрочастицы поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) с рифампицином были получены методом эмульгирования и испарения растворителя, в котором в качестве растворителя и эмульгатора используются соответственно хлороформ и поливиниловый спирт. Микрочастицы получали в диапазоне размеров 20–60 мкм путем изменения исходных концентраций поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата), поливинилового спирта и рифампицина. Методом УФ-спектрофотометрии было получено значение эффективности инкапсуляции 14 %. При оценке антимикробной активности микрокапсул отмечено такое же ингибирование роста *Staphylococcus aureus,* как и у свободного рифампицина при инкубации 20 и 24 ч, но проявление токсических эффектов значительно ниже. Для оценки кинетики высвобождения микрокапсулы инкубировали при 36,5 ± 0,1 °C в среде фосфатного буфера. Концентрацию определяли спектрофотометрически при длине волны 473 нм. Установлено, что почти 90 % препарата, загруженного в микрочастицы, высвобождалось через 24 часа [23].

С помощью микрокапсулирования разработана новая пролонгированная лекарственная форма фурацилина. Лекарственное вещество заключали в двойную оболочку, состоящую из сополимера Eudragit® L100 (внутренняя оболочка) и ПВП и ПВС (внешняя оболочка). Именно внутренняя оболочка обеспечивает пролонгированное высвобождение АФС. Получение микрокапсул осуществляли методом переосаждения полимера (1%-й ацетоновый раствор Eudragit® L100) на поверхности АФС путем замены растворителя (диметилформамид / вода дистиллированная). Полученную дисперсию оставляли на сутки при температуре 0–5 °C. Далее создавали вторую оболочку путем прибавления 2%-го водного раствора ПВС или ПВП. Для полного осаждения к полученной смеси добавляли насыщенный раствор натрия хлорида. Диспергировали с помощью магнитной мешалки и высушивали в сушильном шкафу. В результате исследования кинетики высвобождения методом УФ-спектроскопии (максимум при 367 нм) установлено, что полное высвобождение фурацилина наступает через 140 часов. По данным количественного анализа АФС полностью находится в микрокапсуле. Методом ИК-спектроскопии подтверждено послойное нанесение полимера на фурацилин. Использование данной методики позволяет влиять на скорость высвобождения АФС из микрокапсул, меняя толщину оболочки [24].

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ ПРЕПАРАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Стоит отметить перспективность исследований микрокапсулирования АФС, полученных из лекарственных растений. Объектом исследования является масляный экстракт каротиноидов из туники асцидии пурпурной. Особенность инкапсулирования масляных экстрактов заключается в разработке методов получения стабильных эмульсий, не расслаивающихся на протяжении длительного времени. В качестве полимера использовался альгинат натрия, внешнее покрытие – хитозан. Микрокапсулы получали методом экструзии. Сшивку осуществляли раствором кальция хлорида. Хитозан образует водорастворимый полиэлектролитный комплекс за счет взаимодействия между свободными карбоксильными группами альгината и собственными аминогруппами. Использование пары альгинат натрия / хитозан целесообразно для повышения растворимости микрокапсул за счет хитозана и постепенного высвобождения АФС за счет альгината натрия, что повышает биодоступность АФС. С целью оптимизации эмульгирования и улучшения структуры и стабильности эмульсии использовали обработку ультразвуком. Благодаря этому эмульсия имеет оптимальную структуру и наименьшую вязкость, что позволяет получать микрокапсулы меньшего размера. Таким образом, данная методика микрокапсулирования масляного экстракта каротиноидов может быть использована для получения масляных экстрактов других растений [25].

Масло из необжаренных кофейных зерен широко используется в косметических целях. Получение его микрокапсулированной формы представляет интерес для улучшения антиоксидантной активности под действием света, тепла и кислорода. Полимером служила аравийская камедь, а метод получения – распылительная сушка масляно-водной эмульсии. Полученные микрокапсулы имели сферическую форму с гладкими поверхностями, что подтверждает целесообразность использования аравийской камеди в качестве инкапсулирующего материала. Методом активного кислорода (адаптирован из кондуктометрии) установленная антиоксидантная активность была значительно выше по сравнению с эталонным антиоксидантом α-токоферолом, а в сравнении с чистым маслом наблюдалось 7- и 3-кратное увеличение активности. Полученные результаты свидетельствуют о перспективном промышленном применении данной методики микрокапсулирования масла кофе [26].

Гуарана хорошо известна своим диетическим и фармацевтическим потенциалом, а полуочищенный экстракт гуараны обладает антидепрессивным и паниколитическим действием. Однако низкая растворимость, биодоступность и стабильность полуочищенного экстракта ограничивают его использование в качестве компонента фармацевтических средств. Доставка полуочищенного экстракта в форме микрочастиц может помочь оптимизировать его стабильность. В данном исследовании микрочастицы, содержащие полуочищенный экстракт гуараны, были получены методом распылительной сушки с использованием комбинации гуммиарабика (ГА) и мальтодекстрина (МД) в соотношении 30:70, 40:60 и 50:50. Раствор экстракта и дисперсии ГА/МД перемешивали отдельно в течение 20 мин. Затем раствор экстракта добавляли к дисперсии ГА/МД, перемешивали в течение примерно 5 мин и высушивали распылением. Технология сушки: температура на входе 190 °С, аспирация 80 %, давление 2 Бар, насос от 6 %, температура на выходе 120–130 °С. Технология распылительной сушки и выбранные условия обработки дали удовлетворительную эффективность инкапсуляции (80–110 %) и выход продукта (55–60 %). Средний диаметр микрочастиц составлял около 4,5 мкм. Способность ДППГ к продувке радикалов показала, что микрочастицы могут защитить полуочищенный экстракт гуараны от воздействия высоких температур в процессе поддержания антиоксидантной способности. Испытания на растворение *in vitro* показывают, что все составы полностью растворяются в течение 60 мин. Микрокапсуляция улучшила технологические характеристики порошков и сохранила антиоксидантные свойства. Исследование продемонстрировало целесообразность получения этих микрочастиц для одностадийного процесса с использованием распылительной сушки. Состав каждого препарата влиял на физико-химические характеристики. Этот метод распылительной сушки может быть использован в качестве эффективного и экономичного подхода к получению полуочищенного экстракта микрочастиц гуараны [27].

Проведено исследование по микрокапсулированию лавандового масла с целью защиты компонентов масла от улетучивания. Для получения микрокапсул в качестве полимера использовалась смесь камеди акации и мальтодекстрина, а методом являлась распылительная сушка. Методика распылительной сушки аналогична экстракту гуараны. Размер полученных частиц составлял 12,42 ± 1,79 мкм, эффективность микрокапсулирования – 77,89 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что смесь камеди акации и мальтодекстрина в качестве полимера защищает лавандовое масло от улетучивания компонентов [28].

Одной из проблем применения препаратов растительного происхождения является горький вкус. Для решения этой проблемы используется микрокапсулирование. Исследование инкапсуляции кверцетина в карнаубский воск, шеллак или зеин методом экструзии горячим расплавом показало, что микрокапсулы значительно меньше растворялись в слюне при pH 6,8 по сравнению с чистым кверцетином. Следовательно, данный комплекс хорошо маскирует вкус в порядке зеин > карнаубский воск > шеллак. Анализ горечи *in vitro* с помощью электронного языка подтвердил хорошую маскирующую вкус эффективность микрокапсулированных порошков. Таким образом, термоэкструзионная микрокапсуляция может стать привлекательным методом получения биологически активных порошков с маскировкой вкуса [29].

МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ ВИТАМИНОВ

Было проведено исследование с целью изучения стабильности микрокапсулированной аскорбиновой кислоты в моделируемом желудочно-кишечном тракте *in vitro* и влияния микрокапсулированной аскорбиновой кислоты на биодоступность железа. В качестве материалов покрытия использовались полиглицеролмоностеарат (ПГМС) и среднецепочечный триацилглицерин (МСТ), а в качестве основных материалов – L-аскорбиновая кислота и сульфат железа аммония. При микроинкапсуляции аскорбиновой кислоты с помощью МСТ высвобождение аскорбиновой кислоты составляло 6,3 % при pH 5 и 1,32 % при pH 2 в моделируемых желудочных жидкостях в течение 60 мин. Когда аскорбиновая кислота была инкапсулирована ПГМ, то высвобождалось больше аскорбиновой кислоты в диапазоне от 9,5 до 16,0 %. Для сравнения, высвобождение аскорбиновой кислоты, покрытой МСТ и ПГМ, значительно увеличивалось на 94,7 и 83,8 % соответственно в течение 60 мин инкубации в искусственной кишечной жидкости [30].

α-токоферол является хорошо известным жирорастворимым антиоксидантом и широко используется в пищевой промышленности для стабилизации свободных радикалов. Включение его в пищу и стабильность являются еще одной проблемой, поскольку непосредственно добавленный α-токоферол склонен к инактивации пищевыми компонентами. Данное исследование было направлено на оптимизацию условий инкапсуляции α-токоферола с использованием комбинации альгината натрия (0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 %) в качестве основного стеночного материала и пектина (2,0 %) в качестве наполнителя. Растворы пектина и альгината натрия смешивали до получения однородной смеси. В качестве эмульгатора добавляли твин-80 и 1%-й раствор токоферола. Полученная смесь подвергалась дальнейшей гомогенизации в течение 30 минут на гомогенизаторе. Стабильную эмульсию капали иглой в 5%-й раствор кальция хлорида. Микрокапсулы промывали водой и выдерживали при комнатной температуре 24 часа (шприцевой метод). Эффективность инкапсуляции α-токоферола, установленная методом ВЭЖХ, в микрокапсулы, полученные в оптимальных условиях, составила 52,91 % с использованием альгината натрия 1,5 % и пектина 2,0 %. α-токоферол инкапсулировали с помощью инкапсулятора в стандартных условиях и сравнивали со шприцевым методом. Эффективность инкапсуляции была обнаружена больше (55,97 %) в микрокапсулах, приготовленных с помощью инкапсулятора, и 52,11 % в микрокапсулах, приготовленных с помощью шприца [31].

ДВОЙНЫЕ ЭМУЛЬСИИ – ПОЛУЧЕНИЕ И МЕТОДЫ СТАБИЛИЗАЦИИ

Микрокапсулирование биологически активных веществ методом двойных эмульсий применимо для гидрофильных веществ. Эмульсии стабилизируют полиэлектролитами и противоположно заряженными ПАВ для повышения поверхностной активности. Готовили комплексы хитозана и КсантанГума (ксантановая камедь) смешиванием растворов отдельных соединений с разной концентрацией. Взаимодействие соединений осуществлялось за счет образования ионных связей между положительно заряженными молекулами хитозана (аминогруппы) и отрицательно заряженным КсантанГумом (карбоксильные группы). Растворы использовали через 24 часа после смешивания. Эмульсии готовили ультразвуком. Полученные эмульсии имели межфазное натяжение на границе раздела фаз, которое измеряли с помощью тензиометрии. Межфазное равновесное поверхностное натяжение уменьшается с увеличением концентрации полимеров в растворителе. Использование данных поликомплексов позволяет получить микрокапсулы, обладающие высокой ферментативной устойчивостью. В результате исследований установлено, что использование комплексов Хитозан-КсантанГум целесообразно для получения стабильной двойной эмульсии [32].

Для микрокапсулирования БАВ используются ПАВ различной химической природы, а также подбираются катионные и анионные полиэлектролиты. В связи с этим проведено исследование инкапсулирования масла розмарина методом двойных эмульсий. Для микрокапсулирования масла использовались два вида полиэлектролитов: положительно заряженный (катионный) хитозан и отрицательно заряженные (анионные) камеди (ксантановая, гуаровая, акации). АФС смешивали с ПАВ и вводили в состав поочередно катионный (хитозан) и анионный (камеди) полиэлектролиты. Для установления влияния природы полиэлектролита на агрегативную устойчивость эмульсии проводилось измерение дзетта-потенциала. В результате определено, что эмульсии с ксантановой и гуаровой камедью устойчивы на протяжении 30 дней, дзетта-потенциал составлял −25,86 и −19,66 mV соответственно. Эмульсии с камедью акации неустойчивы, в течение 24 часов наблюдалось выпадение осадка (дзетта-потенциал −0,66 mV). Следовательно, чем выше дзетта-потенциал анионного полиэлектролита, тем более устойчивой будет эмульсия [33].

Разработан способ микрокапсулирования противотуберкулезных препаратов с использованием технологии покрытия полиэлектролитными мультислоями и изучения растворимости микрокапсул при значениях pH, моделирующих различные участки желудочно-кишечного тракта. Для получения микрокапсул использованы полимеры – геллан (1 и 3 %), пектин (1 и 2 %) и альгинат натрия (2 и 3 %). Для получения мультислоев выбраны катионный полиэлектролит – хитозан и анионные полиэлектролиты – декстрансульфат и Eudragit® S. АФС – изониазид, пиразинамид, моксифлоксацина гидрохлорид. Метод получения микрокапсул – ионотропное гелеобразование. Раствор полимера нагревали с АФС до 90 °C и полученную смесь вносили по каплям в 1%-й раствор хлорида кальция. Через 10 минут микрокапсулы промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Методом УФ-спектрометрии установлено содержание пиразинамида и моксифлоксацина, броматометрически – изониазида. При pH = 7,4 степень высвобождения АФС из микрокапсул, без нанесенных мультислоев, составила за 4 часа около 30 % активного ингредиента, за 8 часов около 50 %, за 12 часов – более 80 %. Пролонгация составила 12 часов, что обеспечивает присутствие терапевтических доз лекарственных препаратов в течение дня. Данным методом можно получить противотуберкулезные лекарственные препараты с контролируемым высвобождением в среде кишечника [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микрокапсулирование является перспективным методом создания устойчивых и пролонгированных лекарственных форм. Лекарственные вещества в форме микрокапсул имеют большую биодоступность, стабильность под действием кислой среды желудка, а также максимальную доставку к органу-мишени. Наиболее перспективным и значимым является создание микрокапсул с антибактериальными препаратами, так как проблема резистентности микроорганизмов к существующим препаратам и лекарственным формам стоит очень остро. В то же время процесс микрокапсулирования очень трудоемок и требует предварительной подготовки всех компонентов, а также подбора соответствующих условий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dolçà C., Ferrándiz M., Capablanca L., Franco E., Mira E., López F., García D. Microencapsulation of Rosemary Essential Oil by Co-Extrusion/Gelling Using Alginate as a Wall Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. 2015;5:121–130.
2. Степанова Э. Ф., Ким М. Е., Мурзагулова К. Б., Евсеева С. Б. Микрокапсулы: перспективы использования в современной фармацевтической практике. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;5:767.

3. Грехнёва Е. В., Кудрявцева Т. Н. Особенности микрокапсулирования некоторых лекарственных препаратов в альгинат натрия. *AUDITORIUM*. 2014;3(3):12–16.
4. Маркович Ю. Д., Грехнёва Е. В., Кудрявцева Т. Н., Ефанов С. А., Климова Л. Г. Микрокапсулирование 4-карбоксиакридона в водорастворимые полимеры. *Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета*. 2013;3-2(27):1–5.
5. Грехнёва Е. В., Белоконь В. Л., Орлова С. В. Микрокапсулирование биологически активных веществ в водонерастворимые полимеры. *AUDITORIUM*. 2016;2(10):15–19.
6. Aijaz A., Perera D., Olabisi R. M. Polymeric Materials for Cell Microencapsulation. *Cell Microencapsulation*. 2017:79–93. DOI: 10.1007/978-1-4939-6364-5_6.
7. Yang Y., Opara E. C., Liu Y., Atala A., Zhao W. Microencapsulation of porcine thyroid cell organoids within a polymer microcapsule construct. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(3):286–296. DOI: 10.1177/1535370216673746.
8. Lee J. I., Kim H. W., Kim J. Y., Bae S. J., Joo D. J., Huh K. H., Fang Y. H., Jeong J. H., Kim M. S., Kim Y. S. Microencapsulation of pancreatic islets with canine ear cartilage for immunoisolation. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(4):1091–1094. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.02.015.
9. Patel N., Addo R. T., Ubale R., Uddin M. N., D'Souza M., Jobe L. The effect of antisense to NF-κB in an albumin microsphere formulation on the progression of left-ventricular remodeling associated with chronic volume overload in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(9):796–804. DOI: 10.3109/1061186X.2014.921927.
10. Черникевич И. П., Зиматкина Т. И., Сорокопыт Е. М. Иммобилизация тиаминкиназы из печени свиньи путем микрокапсулирования. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2015;4(52):33–38.
11. Кудряшок Л. С., Тихонов С. Л., Тихонова Н. В., Дьячкова А. В. Микрокапсулирование пепсина и оценка его протеолитических свойств. *Вестник ВСГУТУ*. 2019;3(74):35–41.
12. Isleroglu H., Turker I., Koc B., Tokatli M. Optimization of microencapsulation conditions of transglutaminase by freeze drying. *Journal of Food Science and Technology*. 2019;56(11):4925–4937. DOI: 10.1007/s13197-019-03962-9.
13. Полковникова Ю. А., Северинова Н. А., Корянова К. Н., Тульская У. А, Гречкина М. В. Морфологические, технологические и биофармацевтические исследования альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):279–290. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290.
14. Грехнёва Е. В., Кометиани И. Б., Гусельникова А. О., Петрова Ю. И. Возможности использования методов микрокапсулирования и адсорбции для создания лекарственных препаратов пролонгированного действия. *Образовательный, научный и инновационный процессы в нанотехнологиях. Сборник докладов участников VIII Всероссийской конференции*. 2017. 136–138 с.
15. Mooranian A., Zamani N., Ionescu C. M., Takechi R., Luna G., Mikov M., Goločorbin-Kon S., Kovačević B., Al-Salami H. Oral gavage of nano-encapsulated conjugated acrylic acid-bile acid formulation in type 1 diabetes altered pharmacological profile of bile acids, and improved glycaemia and suppressed inflammation. *Pharmacological Reports*. 2020;72(2):368–378. DOI: 10.1007/s43440-019-00030-z.
16. Kim K. H., Cho S.-A., Lim J. Y., Lim D. G., Moon C., Jeong S. H. Preparation of microcapsules with the evaluation of physicochemical properties and molecular interaction. *Archives of Pharmacal Research*. 2014;37(12):1570–1577. DOI: 10.1007/s12272-013-0306-0.
17. Li F-Q., Ji R.-R., Chen X., You B.-M., Pan Y.-H., Su J.-C. Cetirizine dihydrochloride loaded microparticles design using ionotropic cross-linked chitosan nanoparticles by spray-drying method. *Archives of Pharmacal Research*. 2010;33(12):1967–1973. DOI: 10.1007/s12272-010-1212-3.
18. Уйманова Т. Н., Грехнёва Е. В., Кудрявцева Т. Н., Горобец А. Ю. Возможность микрокапсулирования пробиотиков в кишечнорастворимый полимер Eudragit® L100. *Образовательный, научный и инновационный процессы в нанотехнологиях. Сборник докладов участников VIII Всероссийской конференции*. 2017. 138–142 с.
19. Vaziri A. S., Alemzadeh I., Vossoughi M., Khorasani A. C. Co-microencapsulation of Lactobacillus plantarum and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 2018;199:266–275. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.002.
20. Грехнёва Е. В., Власова В. В. Особенности микрокапсулирования окситетрациклина и цефтриаксона в двойные оболочки. *AUDITORIUM*. 2017;2(14):19–23.
21. Ковязина Н. А., Николаева А. М., Функнер Е. В., Ефимова М. Г. Изучение возможности микрокапсулирования бактериофага. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2014;24(195):205–210.
22. Soykut E. A., Tayyarcan E. K., Evran Ş., Boyacı İ. H., Çakır İ., Khaaladi M., Fattouch S. Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions. *Folia Microbiol*. 2019;64(6):751–763. DOI: 10.1007/s12223-019-00688-1.
23. Durán, N., Alvarenga, M. A., Da Silva E. C., Melo P. S., Marcato P. D. Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Archives of Pharmacal Research*. 2008;31(11):1509–1516. DOI: 10.1007/s12272-001-2137-7.
24. Грехнёва Е. В., Кудрявцева Т. Н. Разработка новой лекарственной формы фурацилина методом микрокапсулирования. *AUDITORIUM*. 2018;2(18):17–23.
25. Пивненко Т. Н., Бунтуш А. Е. Экспериментальное обоснование микрокапсулирования масляного экстракта каротиноидов из туники асцидии пурпурной. *Научные труды Дальрыбвтуза*. 2017;42:82–89.
26. Nosari A. B. F. L., Lima J. F., Serra O. A., Freitas L. A. P. Improved green coffee oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(3):307–311. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.04.006.
27. Klein T., Longhini R., Bruschi M. L., de Mello J. C. P. Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(3):292–300. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.03.010.
28. Burhan A. M., Abdel-Hamid S. M., Soliman M. E., Sammour O. A. Optimisation of the microencapsulation of lavender oil by spray drying. *Journal of Microencapsulation*. 2019;36(3):250–266. DOI: 10.1080/02652048.2019.1620355.
29. Khor C. M., Ng W. K., Kanaujia P., Chan K. P., Dong Y. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. *Journal of Microencapsulation*. 2017;34(1):29–37. DOI: 10.1080/02652048.2017.1280095.
30. Lee J.-B., Ahn J., Lee J., Kwak H.-S. The microencapsulated ascorbic acid releasein vitro and its effect on iron bioavailability. *Archives of Pharmacal Research*. 2003;26(10):874–879. DOI: 10.1007/BF02980035.
31. Singh J., Kaur K., Kumar P. Optimizing microencapsulation of α-tocopherol with pectin and sodium alginate. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(9):3625–3631. DOI: 10.1007/s13197-018-3288-6.
32. Кудасова Д. Е., Муталиева Б. Ж., Сапарбекова А. А., Елеманова Ж. Р. Микрокапсулирование биологически-активных веществ методом двойных эмульсий. *Современные научные исследования и разработки*. 2018;9(26):188–191.
33. Антонова А. С., Носкова Ю. В. Влияние анионного полиэлектролита на устойчивость эмульсии при микрокапсулировании БАВ. *Молодые ученые – развитию Национальной технологической инициативы*. 2019;1(1):67–69.
34. Мусабаева Б. Х., Мурзагулова К. Б., Ким М. Е., Изумрудов В. А., Арипжанова З. Ж. Получение микрокапсул противотуберкулезных препаратов на основе биополимеров и полиэлектролитов. *Фармация и фармакология*. 2017;5(2):164–176.

REFERENCES

1. Dolçà C., Ferrándiz M., Capablanca L., Franco E., Mira E., López F., García D. Microencapsulation of Rosemary Essential Oil by Co-Extrusion/Gelling Using Alginate as a Wall Material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. 2015;5:121–130.
2. Stepanova E. F., Kim M. E., Murzagulova K. B., Evseyeva S. B. Microcapsules: use prospects inmodern pharmaceuticalpractice. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014;5:767. (In Russ.)
3. Grekhneva E. V., Kudryavtseva T. N. *Osobennosti mikrokapsulirovaniya nekotorykh lekarstvennykh preparatov v al'ginat natriya*

[Features of microencapsulation of some drugs in sodium alginate]. *AUDITORIUM*. 2014;3(3):12–16. (In Russ.)
4. Markovich Yu. D., Grekhneva E. V., Kudryavtseva T. N., Efanov S. A., Klimova L. G. *Mikrokapsulirovanie 4-karboksiakridona v vodorastvorimye polimery. Uchenye zapiski. Elektronnyy nauchnyy zhurnal kurskogo gosudarstvennogo universiteta* [Microencapsulation of 4-carboxyacridone into water-soluble polymers]. *Uchjonye zapiski. Jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kurskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2013;3-2(27):1–5. (In Russ.)
5. Grekhneva E. V., Belokon' V. L., Orlova S. V. *Mikrokapsulirovanie biologicheski aktivnykh veshchestv v vodonerastvorimye polimery* [Microencapsulation of biologically active substances in water-insoluble polymers]. *AUDITORIUM*. 2016;2(10):15–19. (In Russ.)
6. Aijaz A., Perera D., Olabisi R. M. Polymeric Materials for Cell Microencapsulation. *Cell Microencapsulation*. 2017:79–93. DOI: 10.1007/978-1-4939-6364-5_6.
7. Yang Y., Opara E. C., Liu Y., Atala A., Zhao W. Microencapsulation of porcine thyroid cell organoids within a polymer microcapsule construct. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(3):286–296. DOI: 10.1177/1535370216673746.
8. Lee J. I., Kim H. W., Kim J. Y., Bae S. J., Joo D. J., Huh K. H., Fang Y. H., Jeong J. H., Kim M. S., Kim Y. S. Microencapsulation of pancreatic islets with canine ear cartilage for immunoisolation. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(4):1091–1094. DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.02.015.
9. Patel N., Addo R. T., Ubale R., Uddin M. N., D'Souza M., Jobe L. The effect of antisense to NF-κB in an albumin microsphere formulation on the progression of left-ventricular remodeling associated with chronic volume overload in rats. *Journal of Drug Targeting*. 2014;22(9):796–804. DOI: 10.3109/1061186X.2014.921927.
10. Chernikevich I. P., Zimatkina T. I., Sorokopyt E. M. Immobilization of thiamine kinase from pig liver by the microencapsulation method. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta = Journal of the Grodno State Medical University*. 2015;4(52):33–38. (In Russ.)
11. Kudryashov L. S., Tikhonov S. L., Tikhonova N. V., Dyachkova A. V. Microcapsulation of pepsin and estimation of its proteolytic properties. *ESSUTM Bulletin*. 2019;3(74):35–41. (In Russ.)
12. Isleroglu H., Turker I., Koc B., Tokatli M. Optimization of microencapsulation conditions of transglutaminase by freeze drying. *Journal of Food Science and Technology*. 2019;56(11):4925–4937. DOI: 10.1007/s13197-019-03962-9.
13. Polkovnikova Yu. A., Severinova N. A., Koryanova K. N., Tulskaya U. A, Grechkina M.V. Morphological, technological and biopharmaceutical studies of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5):279–290. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290.
14. Grekhneva E. V., Kometiani I. B., Gusel'nikova A. O., Petrova Yu. I. *Vozmozhnosti ispol'zovaniya metodov mikrokapsulirovaniya i adsorbtsii dlya sozdaniya lekarstvennykh preparatov prolongirovannogo deystviya. Obrazovatel'nyy, nauchnyy i innovatsionnyy protsessy v nanotekhnologiyakh* [Possibilities of using microencapsulation and adsorption methods to create drugs with prolonged action]. Obrazovatel'nyj, nauchnyj i innovacionnyj processy v nanotehnologijah. Sbornik dokladov uchastnikov VIII Vserossijskoj konferencii. 2017. 136–138 p. (In Russ.)
15. Mooranian A., Zamani N., Ionescu C. M., Takechi R., Luna G., Mikov M., Goločorbin-Kon S., Kovačević B., Al-Salami H. Oral gavage of nano-encapsulated conjugated acrylic acid-bile acid formulation in type 1 diabetes altered pharmacological profile of bile acids, and improved glycaemia and suppressed inflammation. *Pharmacological Reports*. 2020;72(2):368–378. DOI: 10.1007/s43440-019-00030-z.
16. Kim K. H., Cho S.-A., Lim J. Y., Lim D. G., Moon C., Jeong S. H. Preparation of microcapsules with the evaluation of physicochemical properties and molecular interaction. *Archives of Pharmacal Research*. 2014;37(12):1570–1577. DOI: 10.1007/s12272-013-0306-0.
17. Li F-Q., Ji R.-R., Chen X., You B.-M., Pan Y.-H., Su J.-C. Cetirizine dihydrochloride loaded microparticles design using ionotropic cross-linked chitosan nanoparticles by spray-drying method. *Archives of Pharmacal Research*. 2010;33(12):1967–1973. DOI: 10.1007/s12272-010-1212-3.
18. Uymanova T. N., Grekhneva E. V., Kudryavtseva T. N., Gorobets A. Yu. Vozmozhnost' mikrokapsulirovaniya probiotikov v kishechnorastvorimyy polimer Eudragit® L100. *Obrazovatel'nyy, nauchnyy i innovatsionnyy protsessy v nanotekhnologiyakh. Sbornik dokladov uchastnikov VIII Vserossiyskoy konferentsii* [Possibility of microencapsulation of probiotics in the enteric polymer Eudragit®L100. *Educational, scientific and innovative processes in nanotechnology. Collection of reports of the participants of the VIII All-Russian conference*]. 2017. 138–142 p. (In Russ.)
19. Vaziri A. S., Alemzadeh I., Vossoughi M., Khorasani A. C. Co-microencapsulation of Lactobacillus plantarum and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 2018;199:266–275. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.002.
20. Grekhneva E. V., Vlasova V. V. *Osobennosti mikrokapsulirovaniya oksitetratsiklina i tseftriaksona v dvoynye obolochki* [Features of microencapsulation of oxytetracycline and ceftriaxone in double membranes]. *AUDITORIUM*. 2017;2(14):19–23. (In Russ.)
21. Kovyazina N. A., Nikolaeva A. M., Funkner E. V., Yefimovap M. G. Studying of possibility of microencapsulation of the bacteriophage. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Medicina. Farmacija = Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacia*. 2014;24(195):205–210. (In Russ.)
22. Soykut E. A., Tayyarcan E. K., Evran Ş., Boyacı İ. H., Çakır İ., Khaaladi M., Fattouch S. Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions. *Folia Microbiol.* 2019;64(6):751–763. DOI: 10.1007/s12223-019-00688-1.
23. Durán, N., Alvarenga, M. A., Da Silva E. C., Melo P. S., Marcato P. D. Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Archives of Pharmacal Research*. 2008;31(11):1509–1516. DOI: 10.1007/s12272-001-2137-7.
24. Grekhneva E. V., Kudryavtseva T. N. *Razrabotka novoy lekarstvennoy formy furatsilina metodom mikrokapsulirovaniya* [Development of a new dosage form of furacillin by microencapsulation]. *AUDITORIUM*. 2018;2(18):17–23. (In Russ.)
25. Pivnenko T. N., Buntush A. E. Experimental foundetion of microcapsulation of oil extract of carothinoids from tunics of purple ascidian. *Nauchnye trudy Dal'rybvtuz*a. 2017;42:82–89. (In Russ.)
26. Nosari A. B. F. L., Lima J. F., Serra O. A., Freitas L. A. P. Improved green coffee oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(3):307–311. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.04.006.
27. Klein T., Longhini R., Bruschi M. L., de Mello J. C. P. Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;25(3):292–300. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.03.010.
28. Burhan A. M., Abdel-Hamid S. M., Soliman M. E., Sammour O. A. Optimisation of the microencapsulation of lavender oil by spray drying. *Journal of Microencapsulation*. 2019;36(3):250–266. DOI: 10.1080/02652048.2019.1620355.
29. Khor C. M., Ng W. K., Kanaujia P., Chan K. P., Dong Y. Hot-melt extrusion microencapsulation of quercetin for taste-masking. *Journal of Microencapsulation*. 2017;34(1):29–37. DOI: 10.1080/02652048.2017.1280095.
30. Lee J.-B., Ahn J., Lee J., Kwak H.-S. The microencapsulated ascorbic acid releasein vitro and its effect on iron bioavailability. *Archives of Pharmacal Research.* 2003;26(10):874–879. DOI: 10.1007/BF02980035.
31. Singh J., Kaur K., Kumar P. Optimizing microencapsulation of α-tocopherol with pectin and sodium alginate. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(9):3625–3631. DOI: 10.1007/s13197-018-3288-6.
32. Kudasova D. E., Mutaliyeva B. Zh., Saparbekova A. A., Elemanova Zh. R. Microencapsulation of biologically active substances by the method of double emulsions. *Sovremennye nauchnye issledovanija i razrabotki*. 2018;9(26):188–191. (In Russ.)
33. Antonova A. S., Noskova Yu. V. *Vliyanie anionnogo polielektrolita na ustoychivost' emul'sii pri mikrokapsulirovanii BAV* [Effect of anionic polyelectrolyte on the stability of the emulsion during microencapsulation of biologically active substances]. *Molodye uchjonye – razvitiju Nacional'noj tehnologicheskoj iniciativy*. 2019;1(1):67–69. (In Russ.)
34. Mussabayeva B. H., Murzagulova K. B., Kim M. E., Izumrudov V. A., Aripzhanova Z. Zh. Encapsulation of antitubercular drugs by biopolymers and polyelectrolyte multilayers. *Farmatsiya i farmakologiya = Pharmacy & Pharmacology*. 2017;5(2):164–176. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-62-67
УДК 615.11

Оригинальная статья / Research article

Получение таблеток динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола и разработка методик контроля их качества

А. М. Доманина[1]*, М. В. Черников[1], И. П. Ремезова[1], Э. Ф. Степанова[1], А. М. Шевченко[1], А. В. Морозов[2]

[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] ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Минпромторга России, лаборатория аналитических методов исследования, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

***Контактное лицо:** Доманина Ангелина Михайловна. **E-mail:** lina.kirilyuk.00@mail.ru

ORCID: А. М. Доманина – https://orcid.org/0000-0001-5228-2730; М. В. Черников – https://orcid.org/0000-0001-8340-1296;
И. П. Ремезова – https://orcid.org/000-0003-3456-8553; Э. Ф. Степанова – https://orcid.org/0000-0002-4082-3330;
А. М. Шевченко – https://orcid.org/0000-0002-7541-2558; А. В. Морозов – https://orcid.org/0000-0002-8987-2651.

Статья поступила: 13.01.2021 **Статья принята в печать:** 19.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. В настоящее время для лечения язвенной болезни желудка применяются лекарственные средства с комбинированным действием. Для устранения возможных побочных эффектов применяемых средств продолжается поиск новых молекул для создания более эффективных и безопасных H_2-рецепторов гистамина. В качестве возможного решения указанных проблем нами исследована субстанция динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола (ДФДБ).

Цель. Целью настоящего исследования явилось получение таблеток динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола и разработка методик контроля их качества.

Материалы и методы. Объектом изучения являлись таблетки на основе субстанции ДФДБ. Изучали физико-химические и технологические свойства таблетированной лекарственной формы. Фармако-технологические и физико-химические показатели определяли по методикам Государственной фармакопеи XIV издания. Идентификацию и количественное определение ДФДБ в таблетках проводили методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. На основе физико-химических свойств и определения основных технологических показателей ДФДБ разработана оптимальная технология таблетирования. Разработан оптимальный состав таблеток. Идентификацию таблеток предлагается проводить с использованием ВЭЖХ в сравнении состандартным образцом ДФДБ. Родственные примеси, согласно полученным данным, не превышают 0,1 %. Нами было установлено, что антимикробное действие таблетки не оказывают. Анализируемые таблетки соответствуют категории 3А. Содержание ДФДБ должно быть от 95 до 105 % от заявленного количества в одной таблетке. В ходе анализа нами проведены биофармацевтические и технологические исследования готовой лекарственной формы в процессе хранения в условиях долгосрочного испытания стабильности в банках полимерных с навинчивающимися крышками. Показано, что выбранный состав вспомогательных веществ и технология получения обеспечивают стабильность готовой лекарственной форме в течение двух лет хранения при соблюдаемых условиях. Для выбора технологии таблетирования проанализированы основные технологические свойства субстанции ДФДБ. Осуществлен выбор вспомогательных веществ и состав пленочного покрытия.

Заключение. Разработана технология и предложена стандартизация таблеток на основе субстанции ДФДБ.

Ключевые слова: производное бензимидазола, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия, стандартизация, качественный и количественный анализ, коэффициент прессуемости, технологические свойства субстанции

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Черников участвовал в разработке субстанции и изучении фармакологических свойств ДФДБ. Э. Ф. Степанова, А. М. Шевченко разработали технологию получения таблеток. И. П. Ремезова, А. В. Морозов, А. М. Доманина разработали методики анализа таблеток, провели биофармацевтические исследования, определения сроков годности.

Для цитирования: Доманина А. М., Черников М. В., Ремезова И. П., Степанова Э. Ф., Шевченко А. М., Морозов А. В. Получение таблеток динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола и разработка методик контроля их качества. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):62–67. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-62-67

Preparation of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole dinitrate tablets and development of quality control methods

Angelina M. Domanina[1]*, Maxim V. Chernikov[1], Irina P. Remezova[1], Eleonora F. Stepanova[1], Alexander M. Shevchenko[1], Andrey V. Morozov[2]

[1] Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinina av., Pyatigorsk-32, 357532, Russia
[2] State Institute of Drugs and Good Practices, laboratory of analytical research methods, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

***Corresponding author:** Angelina M. Domanina. **E-mail:** lina.kirilyuk.00@mail.ru

ORCID: Angelina M. Domanina – https://orcid.org/0000-0001-5228-2730; Maxim V. Chernikov – https://orcid.org/0000-0001-8340-1296;
Irina P. Remezova – https://orcid.org/000-0003-3456-8553; Eleonora F. Stepanova – https://orcid.org/0000-0002-4082-3330;
Alexander M. Shevchenko – https://orcid.org/0000-0002-7541-2558; Andrey V. Morozov – https://orcid.org/0000-0002-8987-2651.

Received: 13.01.2021 **Revised:** 19.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Currently, for the treatment of gastric ulcer, drugs with a combined effect are used. To eliminate possible side effects of the drugs used, the search for new molecules to create more effective and safe histamine H2 receptors continues. As a possible solution to these problems, we investigated the substance dinitrate of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α] benzimidazole (DFDB).

Aim. The aim of this study was to obtain 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole dinitrate tablets and develop methods for quality control.

Materials and methods. The object of study was tablets based on the substance DF DB. The physicochemical and technological properties of the tablet dosage form were studied. Pharmaco-technological and physico-chemical indicators were determined according to the methods of the State Pharmacopoeia of the XIV edition. Identification and quantitative determination of DFDB in tablets was performed by HPLC.

Results and discussion. Based on the physico-chemical properties and determination of the main technological indicators of DFDB, an optimal tableting technology has been developed. The optimal composition of tablets has been developed. Identification of tablets is proposed to be carried out using HPLC in comparison with the standard sample of DFDB. Related impurities, according to the data obtained, do not exceed 0.1 %. We found that the tablets do not have an antimicrobial effect. The analyzed tablets correspond to category 3A. The content of DFDB should be from 95 to 105 % of the declared amount in one tablet. During the analysis, we conducted biopharmaceutical and technological studies of the finished dosage form during storage under the conditions of long-term stability testing in polymer cans with screw-on lids. It is shown that the selected composition of excipients and the production technology ensure the stability of the finished dosage form for two years of storage under the observed conditions. To select the tableting technology, the main technological properties of the DFDB substance are analyzed. The choice of excipients and the composition of the film coating was carried out.

Conclusion. The technology is developed and standardization of tablets based on the substance DFDB is proposed.

Keywords: benzimidazole derivative, HPLC, UV-spectrophotometry, standardization, qualitative and quantitative analysis, compressibility factor, technological properties of the substance

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maxim V. Chernikovparticipated in the development of the substance dinitrate 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole. Eleonora F. Stepanova, Alexander M. Shevchenkodeveloped a technology for obtaining tablets. Irina P. Remizova, Andrey V. Morozov, Angelina M. Domanina developed methods for analyzing tablets, conducted biopharmaceutical studies, and determined shelf life.

For citation: Domanina A. M., Chernikov M. V., Remezova I. P., Stepanova E. F., Shevchenko A. M., Morozov A. V. Preparation of 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole dinitrate tablets and development of quality control methods. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):62–67. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-62-67

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько лет ведется изыскание и изучение новых средств для лечения и профилактики язвенной болезни желудка, при этом наиболее перспективным считаются средства с комбинированным типом действия: угнетающие секрецию соляной кислоты в желудке, гастропротективной активностью и влияющие на процессы ульцерогенеза, вызванные *Helicobacter pylori*. Несмотря на широкое внедрение ингибиторов водородно-калиевой АТФазы, наряду с ними блокаторы H_2-рецепторов гистамина продолжают оставаться одним из наиболее распространенных противоязвенных препаратов. Из блокаторов H_2-рецепторов гистамина в настоящее время используются ранитидин, фамотидин и низатидин, которые не лишены побочных эффектов. Поэтому поиск новых молекул для создания более эффективных и безопасных H_2-рецепторов гистамина продолжается и в настоящее время. В качестве возможного решения указанных проблем нами исследована субстанция динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола (ДЭФБ), которая была получена в ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». Предварительные фармакологические исследования в отношении предложенной субстанции показали ее противоязвенную активность [1].

Целью настоящего исследования явилось получение таблеток динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола и разработка методик контроля их качества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Потеря в массе при высушивании определена по методике ОФС.1.2.1.0010.15 [2] на анализаторе влажности «ЭЛВИЗ-2С» (ТУ 4215-001-52853551-00) (ООО НПП «ЭЛИЗА», Россия).

Сыпучесть и угол естественного откоса определены на приборе ВП-12а по методикам ОФС.1.4.2.0016.15 [2].

Насыпной объем рассчитывали как отношение массы порошка к объему при свободном насыпании до уплотнения и после вибрационного уплотнения согласно ОФС.1.4.2.00016.15 [2].

Коэффициент прессуемости рассчитывали как отношение разности насыпной плотности с уплотнением и насыпной плотности без уплотнения к значению насыпной плотности без уплотнения, умноженному на 100 [3].

Прочность таблеток на раздавливание определяли на тестере прочности ERWEKA TBH 325 (ERWEKA GmbH, Германия) согласно ОФС.1.4.2.0011.15 [2].

Силу выталкивания ($P_в$) определяли на лабораторном гидравлическом прессе по усилию на поверхности пуансонов по методике [3].

Истираемость таблеток определяли согласно методике ОФС.1.4.2.0004.15.

Распадаемость таблеток определяли согласно методике ОФС.1.4.2.0013.15 [2].

Покрытие таблеток оболочкой осуществляли на установке для покрытия GMPC I Mini-coater (Glatt, Германия).

Подлинность устанавливали методом ВЭЖХ и с помощью химической реакции. Методика ВЭЖХ предложена на основании физико-химических свойств субстанции и выполнялась в соответствии с требованиями [2].

В работе использовали жидкостной хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, США) с УФ-детектором. Условия хроматографирования: колонка Luna C-18, 150 × 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм (Phenomenex, США); подвижная фаза: ацетонитрил (Panreac, Испания) – 0,05 М кислота фосфорная (Panreac, Испания) pH 3,9–4,0 (35 : 65), скорость потока 1,0 мл/мин, длина волны 275 нм, температура колонки 30 °C, температура образца 15 °C, объем пробы 20 мкл.

Для приготовления исследуемого раствора около 0,1730 г порошка растертых таблеток помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде и доводили объем мерной колбы до метки тем же растворителем. Полученный раствор фильтровали через беззольный фильтр, 1 мл полученного фильтрата центрифугировали.

Аттестация используемой субстанции в качестве СО проводилась по показателям на основании значений показателей субстанции: описание, растворимость, подлинность (спектр ЯМР ^{1}H, ИК-спектр, УФ-спектр), температура плавления, прозрачность раствора, цветность раствора, pH, родственные примеси, сульфатная зола, тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании, количественное определение. Содержание основного вещества составляло 99,61 %, родственные примеси составляли не более 0,1 %.

Приготовление раствора стандартного образца (СО): около 0,1000 г субстанции растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 100,0 мл. 1 мл полученного раствора фильтровали через Nylon Membrane, 0,2 нм 25 мм (Syringe Filters, Phenomenex, США). Полученный фильтрат центрифугировали.

Для подтверждения подлинности использовали качественную реакцию на нитрат-ион [4]. К 0,1 г порошка растертых таблеток прибавляли две капли раствора дифениламина.

Родственные примеси. Определение проводили методом ВЭЖХ. Приготовление испытуемого раствора аналогично описанному в разделе «Подлинность методом ВЭЖХ».

Содержание примеси в таблетках (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot 100}{\sum S_i},$$

где ΣS_i – сумма площадей всех пиков на хроматограмме; S_1 – площадь пика примеси.

Растворение проводили по методике ОФС.1.4.2.0014.15 [2] на приборе типа «Вращающаяся корзинка». Среда растворения – вода очищенная, объем среды растворения – 900 мл, скорость вращения корзинки – 100 об/мин, время растворения – 45 мин. После растворения анализируемый раствор фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный 1,0 мл фильтрата помещали в мерную колбу 10,0 мл и доводили объем раствора водой до метки. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 275 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду.

Однородность дозирования определяли по методике ОФС.1.4.2.0008.15 [2] по способу 1. Содержание действующего вещества определяли спектрофотометрическим методом.

Одну таблетку помещали в мерную колбу 250,0 мл и растворяли при постоянном перемешивании в 100 мл воды очищенной. Полученный раствор доводили до метки и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Далее 2,0 мл фильтрата помещали в мерную колбу на 50,0 мл, доводили до метки водой. Измерение проводили на спектрофотометре при длине волны 275 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Приготовление раствора СО: 100 мг (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу на 100,0 мл и растворяли в 70 мл воды, доводя объем раствора водой до метки. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу 100,0 мл, доводили до метки.

Микробиологическую чистоту определяли по требованиям ОФС.1.2.4.0002.15 [2].

Количественное определение проводили методом ВЭЖХ [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По физико-химическим свойствам субстанция ДЭФБ представляла собой мелкокристаллический порошок белого или светло-серого цвета. При хранении желтеет на свету. Умеренно растворима в воде, мало растворима в спирте 95 %, очень мало – в хлороформе. Содержание ДЭФБ в субстанции – не менее 99,0 % [5]. Для выбора оптимальной технологии таблетирования необходимо было проанализировать основные технологические показатели (таблица 1).

Полученные данные свидетельствуют о том, что данная субстанция является гигроскопичным порошком с малой насыпной плотностью, с неудовлетворительными показателями сыпучести, давления

Таблица 1. Характеристики технологических свойств субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-α]бензимидазола

Table 1. Characteristics technological properties of the substance 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-α]benzimidazole dinitrate

Наименование показателя Indicator name	**Размеренность** Dimensionality	**Числовые показатели** Numerical indicators		**Соответствие нормативам** Conformity regulations
		экспериментально установленные experimentally established	**нормативные данные** regulatory data	
Остаточная влажность Residual moisture	%	3,47 ± 0,15	Не более 5 % No more 5 %	Соотв. Corresponding
Сыпучесть: без вибрации с вибрацией Looseness: vibration free with vibration	г/с g/s	отсутствует 1,8 ± 0,18 absent 1.8 ± 0.18	Не менее 3,0 No less 3.0	Не соотв. Not acc.
Насыпная плотность: без уплотнения с уплотнением Bulk density: without seal with seal	$кг/м^3 \cdot 10^{-3}$ $kg/m^3 \cdot 10^{-3}$	0,235 ± 0,025 0,588 ± 0,062 0.235 ± 0.025 0.588 ± 0.062	Не менее 0,6 No less 0.6	Не соотв. Not acc.
Угол естественного откоса Angle of repose	град. degrees	52°	Не более 45° No more 45°	Не соотв. Not acc.
Давление выталкивания Ejection pressure	$МН/м^2$ MN/m^2	29,5 ± 1,5	Не более 10 No more 10	Не соотв. Not acc.
Прессуемость Compressibility	Н	88,5 ± 0,70	Не менее 30 No less 30	Соотв. Corresponding
Распадаемость мод. таблеток Disintegration of mod. tablets	мин minute	10,5 ± 0,85	Не более 15 No more 15	Соотв. Corresponding

выталкивания, но с хорошей прессуемостью и удовлетворительной распадаемостью модельных прессовок. В связи с этим необходимо было провести выбор вспомогательных веществ для влажной грануляции, обеспечивающих получение таблеток-ядер определенной прочности с учетом покрытия таблеток оболочкой.

В результате выбора вспомогательных веществ, обеспечивающих оптимальную стабильность, технологические и биофармацевтические свойства таблеток был выбран состав (таблица 2).

Методики контроля качества полученных таблеток разработаны на основе требований ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки». Испытания по показателям контроля качества таблеток проводили согласно соответствующим общим фармакопейным статьям (ОФС) ГФ XIV.

По предложенным показателям нами проведены биофармацевтические и технологические исследования готовой лекарственной формы в процессе хранения в условиях долгосрочного испытания стабильности (температура 25 °C, относительная влажность воздуха 45 %) в банках полимерных с навинчивающимися крышками. Показано, что выбранный состав вспомогательных веществ и технология получения обеспечивают стабильность готовой лекарственной формы в течение двух лет хранения при соблюдаемых условиях.

Таблица 2. Состав и масса таблетки

Table 2. The composition and weight of the tablet

Наименование ингредиентов Name of ingredients	**Количество** Amount	
	г/таб. g/pill	**%**
Ядро таблетки: *Pill corex:*		
ДФДБ DFDB	0,060	30,0
Лактоза моногидрат Lactose monohydrate	0,050	25,0
Кальция фосфат двузамещенный Calcium phosphate disubstituted	0,070	35,0
Крахмал кукурузный высушенный Dried corn starch	0,017	8,5
Коллидон 30 Kollidon 30	0,0015	0,75
Кальция стеарат Calcium stearate	0,0015	0,75
Оболочка *Shell*		
Опадрай II белый, марки 33G28435, в том числе: титана диоксид, полиэтиленгликоль 6000, гипромеллоза, краситель Киви (E 133) Opadray II white, grade 33G28435, including: titanium dioxide, polyethylene glycol 6000, hypromellose, Kiwi dye (E 133)	0,00848	4,24
Средняя масса таблетки с оболочкой (г) Average weight of a coated tablet (g)	0,20848	100,00

Таблица 3. **Показатели контроля качества полученных таблеток**

Table 3. **Quality control indicators of the obtained tablets**

Наименование показателя Indicator name	**Методы** Methods	**Нормы** Norms	**Результаты** Results
Описание Description	Визуальный Visual	Двояковыпуклые таблетки светло-зеленого цвета Light green biconvex tablets	Двояковыпуклые таблетки светло-зеленого цвета Light green biconvex tablets
Подлинность Authenticity	ВЭЖХ HPLC	Время удерживания пика ДФДБ на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме раствора СО The retention time of the DPDB peak in the chromatogram of the test solution should correspond to the retention time of the peak in the chromatogram of the CO solution	Время удерживания пика ДФДБ на хроматограмме испытуемого раствора соответствует времени удерживания пика на хроматограмме раствора СО The retention time of the DPDB peak in the chromatogram of the test solution should correspond to the retention time of the peak in the chromatogram of the CO solution
	Качественная реакция на нитраты Qualitative reaction for nitrates	Синее окрашивание Blue staining	Синее окрашивание Blue staining
Родственные примеси Related impurities	ВЭЖХ HPLC	Содержание примеси должно быть не более 0,1 % The impurity content should be no more than 0.1 %	0,09 %**
Прочность на раздавливание Crushing strength	ГФ XIV State Pharmacopoeia XIV	Не ниже 30 Н Not less 30 H	35 Н*
Распадаемость Disintegration	ГФ XIV State Pharmacopoeia XIV	Таблетки должны распадаться в воде в течение 30 мин The tablets should disintegrate in water within 30 minutes	Таблетки распадаются в воде в течение 30 мин The tablets should disintegrate in water within 30 minutes
Растворение Dissolution	ГФ XIV State Pharmacopoeia XIV	Не менее 75 ± 5 % от заявленного количества ДФДБ Not less than 75 ± 5 % of the declared amount of DFDB	86 %*
Однородность дозирования Dosing uniformity	ГФ XIV State Pharmacopoeia XIV	В таблетке должно находиться не менее 88 % от заявленного количества ДФДБ The tablet must contain at least 88% of the declared amount of DFDB	90,5 %*
Микробиологическая чистота Microbiological purity	ГФ XIV State Pharmacopoeia XIV	Категория 3А Category 3A	Соответствуют категории 3А Compliant with category 3A
Количественное определение Quantitation	ВЭЖХ HPLC	От 95 до 105 % от заявленного количества в одной таблетке From 95 to 105 % of the declared amount in one tablet	99,4 %*

Примечание. * Приведены средние значения параллельных определений 6 серий таблеток.

** На хроматограмме испытуемого раствора наблюдались два пика: 1 – примесь; 2 – пик основного вещества. Достоверность полученных данных подтверждалась валидацией методики по показателям: специфичность и предел обнаружения.

Note. * The average values of parallel determinations of 6 series of tablets are given.

** Two peaks were observed on the chromatogram of the test solution: 1 – impurity; 2 – peak of the main substance. The reliability of the data obtained was confirmed by the validation of the method according to the indicators: specificity and detection limit.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология и предложена стандартизация таблеток на основе субстанции ДФДБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спасов А. А., Петров В. И., Анисимова В. А., Минкин В. И., Черников М. В. Лекарственная субстанция для подавления геликобактероподобных эрозивно-язвенных повреждений слизистой оболочки желудка. Патент РФ № 2395282.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издания. ОФС.1.2.1.2.0005.15. Т. 1. М.: ФЕМБ; 2018. 1814 с.
3. Алексеев К. В., Кедик С. А., Блынская Е. В., Алексеев В.К., Масленникова Н. В. Фармацевтическая технология. Таблетки. М.: ИФТ; 2015. С. 477–565.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издания. ОФС.1.2.2.0001.15. Т. 1. М.: ФЕМБ; 2018. 914 с.
5. Ступина Д. О., Ремезова И. П., Морозов А. В. Разработка способов контроля качества субстанции РУ-64. Во имя жизни и здоровья: материалы 71-й Международной научно-практической конференции. Пятигорск; 2018. С. 88–97.

REFERENCES

1. Spasov A. A., Petrov V. I., Anisimova V. A., Minkin V. I., Chernikov M. V. *Lekarstvennaya substantsiya dlya podavleniya gelikobakteropodobnykh erozivno-yazvennykh povrezhdeniy slizistoy obolochki zheludka* [Medicinal substance for suppressing Helicobacter-like erosive and ulcerative lesions of the gastric mucosa]. Patent RUS № 2395282. (In Russ.)
2. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya. OFS.1.2.1.2.0005.15* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. OFS.1.2.1.2.0005.15]. V. 1. Moscow: FEMB; 2018. 1814 p. (In Russ.)
3. Alekseev K. V., Kedik S. A., Blynskaya E. V., Alekseev V. K., Maslennikova N. V. *Farmatsevticheskaya tekhnologiya. Tabletki* [Pharmaceuticaltechnology. Tablets]. Moscow: IFT; 2015. P. 477–565. (In Russ.)
4. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniya. OFS.1.2.2.0001.15* [State Pharmacopoeiaofthe Russian Federation. XIV edition. OFS.1.2.2.0001.15]. V. 1. Moscow: FEMB; 2018. 914 p. (In Russ.)
5. Stupina D. O., Remezova I. P., Morozov A. V. *Razrabotka sposobov kontrolya kachestva substantsii RU-64. Vo imya zhizni i zdorov'ya: materialy 71-y Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Development of methods for quality control of the substance RU64: in the name of life and health: materials of the 71st International scientific and practical conference]. Pyatigorsk; 2018. P. 88–97. (In Russ.)

thermo scientific
TRACE 1310
thermo scientific
TRIPLUS 500

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79
УДК 543.865/.867

Оригинальная статья / Research article

Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ

О. В. Тринеева*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» (ВГУ), фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии, 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

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

ORCID: О. В. Тринеева – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Статья поступила: 26.02.2021 **Статья принята в печать:** 06.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Как известно, подбор оптимальных условий анализа извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения, характеризующихся сложным вариабельным составом биологически активных веществ (БАВ), методом ТСХ представляет определенные трудности. Для конструирования подвижных фаз для разделения смесей БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента применяются следующие подходы: литературные источники; стандартные подвижные фазы; метод «элюирования пятна»; схема, предложенная фирмой Camag (Швейцария); модель «ПРИЗМА»; вариокамеры и др. В зарубежной литературе встречаются публикации по обобщению имеющихся экспериментальных данных по определению различных природных групп БАВ в объектах растительного происхождения. Однако в подобных обзорах не выявлены закономерности хроматографического поведения отдельных БАВ в тонком слое, а также влияние различных факторов на воспроизводимость величин R_f. Изучение возможности теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования групп БАВ различной полярности, позволяющих провести их разделение, идентификацию и количественное определение методом ТСХ является актуальным и мало разработанным направлением хроматографии в целом.

Цель. Целью настоящей работы являлась разработка теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента.

Материалы и методы. Для исследования закономерностей хроматографического поведения в тонком слое представителей основных классов БАВ, присутствующих в ЛРС (аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, простые сахара, аскорбиновая кислота, жирорастворимые витамины), было изучено значение основного фактора, влияющего на параметры эффективности хроматографического процесса – полярности элюента. В качестве объектов исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной, выпускаемое отечественным производителем, соответствующее требованиям нормативной документации, а также плоды облепихи крушиновидной, собранные на территории Воронежской области, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп в свежем и высушенном виде.

Результаты и обсуждение. Установлены закономерности элюирования и математические модели, описывающие хроматографическое поведение растительных БАВ в тонком слое сорбента. По совокупности полученных результатов с позиций эффективности хроматографического процесса были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия их ТСХ-анализа. Для исследования качественного состава БАВ и достижения четкого разделения зон на хроматограммах разработаны и апробированы на изучаемом ЛРС ТСХ-методики с применением простого, фронтального или двумерного хроматографирования.

Заключение. Показано, что определение и разделение в тонком слое сорбента гидрофильных и липофильных БАВ ЛРС при совместном присутствии требует различных подходов и приемов. В работе предложен алгоритм выбора подвижной фазы и приемов хроматографирования БАВ ЛРС. Выявленные математические модели, описывающие хроматографическое поведение БАВ, позволят подбирать условия, в которых возможно определять отдельные составляющие многокомпонентных смесей без предварительного разделения. Разработанные методики определения БАВ могут быть также использованы для стандартизации и оценки качества других видов ЛРС, фитопрепаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, полярность элюента, биологически активные вещества растительного происхождения

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Автор осуществлял обзор литературы, его систематизацию и анализ, проводил экспериментальные исследования, а также написал текст статьи, в том числе заключение и обсуждение результатов.

Для цитирования: Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):69–79. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79

Development of Theoretical Approaches to Determination of the Main Groups of Biologically Active Substances of Medicinal Plant Raw Materials by TLC Method

Olga V. Trineeva*

Voronezh State University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, 1, University sq., Voronezh, 394006, Russia

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

ORCID: Olga V. Trineeva – https://orcid.org/0000-0002-1421-5067.

Received: 26.02.2021 **Revised:** 06.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. As is known, the selection of optimal conditions for the analysis of extracts from medicinal plant raw materials (MPM), as well as medicinal herbal preparations and pharmaceutical substances of plant origin, characterized by a complex variable composition of biologically active substances (BAS) by TLC, presents certain difficulties. For the design of mobile phases for the separation of mixtures of BAS of plant origin, in a thin layer of sorbent, the following approaches are used: literary sources; standard mobile phases; spot elution method; the scheme proposed by the firm Camag (Switzerland); model "PRISMA"; variocameras and others. In foreign literature, there are publications on the generalization of the available experimental data on the determination of various natural groups of BAS in objects of plant origin. However, such reviews did not reveal the regularities of the chromatographic behavior of individual BAS in a thin layer, as well as the influence of various factors on the reproducibility of R_f values. The study of the possibility of a theoretical approach to the choice of optimal conditions for chromatography of groups of BAS of different polarity, allowing them to separate, identify and quantify by TLC is a relevant and poorly developed area of chromatography in general.
Aim. The aim of this work was to develop a theoretical approach to the choice of optimal conditions for the chromatographic separation of various groups of BAS of plant origin in a thin layer of sorbent.
Materials and methods. To study the regularities of chromatographic behavior in a thin layer of representatives of the main classes of BAS present in MPM (amino acids, flavonoids, tannins, simple sugars, ascorbic acid, fat-soluble vitamins), the value of the main factor affecting the parameters of the efficiency of the chromatographic process, the polarity of the eluent, was studied. As objects of research, we used ready-made chopped raw material of nettle leaves, produced by a domestic manufacturer, that meets the requirements of regulatory documents, as well as sea buckthorn fruits collected on the territory of the Voronezh region, according to the rules for harvesting MPM of various morphological groups in fresh and dried form.
Results and discussion. The regularities of elution and mathematical models describing the chromatographic behavior of plant BAS in a thin layer of sorbent have been established. Based on the totality of the results obtained, from the standpoint of the efficiency of the chromatographic process, the optimal conditions for their TLC analysis were selected and theoretically substantiated. To study the qualitative composition of BAS and to achieve a clear separation of zones on chromatograms, TLC methods were developed and tested on the studied MPM using simple, frontal or two-dimensional chromatography.
Conclusion. It is shown that the determination and separation in a thin layer of the sorbent of hydrophilic and lipophilic BAS of MPM in the presence of a joint requires different approaches and techniques. The paper proposes an algorithm for the selection of the mobile phase and methods of chromatography of BAS of medicinal products. The revealed mathematical models describing the chromatographic behavior of BAS will make it possible to select the conditions under which it is possible to determine the individual components of multicomponent mixtures without preliminary separation. The developed methods for the determination of BAS can also be used for standardization and quality assessment of other types of MPM, phytopreparations and pharmaceutical substances of plant origin.

Keywords: thin layer chromatography, eluent polarity, biologically active substances of plant origin

Conflict of interest. The author declares that he has no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The author carried out a review of the literature, its systematization and analysis, and conducted experimental studies. The author wrote the text of the article, including the conclusion and discussion of the results.

For citation: Trineeva O. V. Development of theoretical approaches to determination of the main groups of biologically active substances of medicinal plant raw materials by TLC method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79

ВВЕДЕНИЕ

В научной литературе давно известны и описаны примеры теоретических подходов к решению задач разделения многокомпонентных смесей [1–4] методом ТСХ. Особенные трудности представляет подбор оптимальных условий анализа извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения, которые, как известно, имеют сложный вариабельный состав биологически активных веществ (БАВ). Для конструирования подвижных фаз для разделения смесей БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента применяются следующие подходы: литературные источники; стандартные подвижные фазы; метод «элюирования пятна»; схема, предложенная фирмой Camag (Швейцария); модель «ПРИЗМА»; вариокамеры [1–3] и др. В практической работе при использовании подвижных фаз, полученных из литературных источников, для разделения определенной группы соединений необходимо учитывать: тип сорбента; марку сорбента; толщину слоя сорбента; условия промывания и активирования пластинок перед работой; тип камеры, в которой осуществлялось элюирование; насыщение камеры; время насыщения камеры, а в некоторых случаях и пластинки; температуру и относительную влажность воздуха лабораторного помещения; наличие и содержание стабилизаторов в растворителях. Только при учете всех перечисленных выше факторов можно воспроизвести разделение с приемлемым разрешением и селективностью. Наиболее широко используются схема, предложенная фирмой Camag, и модель «ПРИЗМА» [5].

Схема оптимального выбора подвижной фазы, предложенная фирмой Camag, включает четыре ступени: исследуемая смесь на первом этапе подвергается разделению в 12 растворителях, имеющих различную силу. На втором этапе производится увеличение или уменьшение силы растворителя, в случае использования которого наблюдалось разделение компонентов смеси с помощью добавления воды или *н*-гексана. На третьем этапе, в случае необходимости, добавляется модификатор кислой или основной природы в трехкомпонентную систему. На четвертом этапе производится выбор оптимальной по селективности элюирующей системы посредством вариации компонентов подвижной фазы, полученной на третьем этапе [5].

Модель «ПРИЗМА» была разработана Ш. Нейреди для подбора и оптимизации элюирующих систем в прямофазовой и обращеннофазовой планарной хроматографии. Эта модель представляет собой трехмерный вариант треугольника Л. Снайдера, который является основанием призмы. Модель дает принципиальную возможность, комбинируя составом – 2-5-компонентного элюента, осуществить разделение исследуемых смесей с высоким разрешением и селективностью. В практической работе первоначально испытывается смесь растворителей, взятая в соотношении (1:1:1), и если величины R_f компонентов исследуемой смеси лежат в диапазоне выше 0,7, то к четырехкомпонентному элюенту добавляют дополнительно *н*-гексан, а в случае $R_f < 0,2$ к элюенту добавляется вода. Затем проверяют селективность в точках 8:1:1, 1:8:1 и 1:1:8. Если полученные результаты по разделению смеси будут удовлетворительными, проверяют селективность разделения в точках 7 : 2 : 1, 2 : 7 : 1 и 1 : 2 : 7, а также в их окрестностях, добиваясь наилучшей селективности и эффективности разделения. После нахождения оптимального соотношения компонентов элюента можно провести дополнительную оптимизацию (по селективности и разрешению), увеличивая или уменьшая силу элюента и/или количество модификатора [5].

В зарубежной литературе также встречаются публикации по обобщению имеющихся экспериментальных данных по определению различных природных групп БАВ в объектах растительного происхождения [6–12]. Однако в подобных обзорах не выявлены закономерности хроматографического поведения отдельных БАВ в тонком слое, а также влияние различных факторов на воспроизводимость величин R_f.

К недостаткам таких подходов можно отнести следующее: отсутствие учета газовой фазы в хроматографической камере; трудности при разделении сильнополярных соединений, к которым относятся большинство групп растительных БАВ; расхождение между расчетными данными и результатами, полученными на практике [5], а также длительность и трудоемкость.

Изучение возможности теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографирования групп БАВ различной полярности, позволяющих провести их разделение, идентификацию и количественное определение методом ТСХ, является актуальным и мало разработанным направлением хроматографии в целом.

В связи с вышесказанным целью являлась разработка теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования закономерностей хроматографического поведения в тонком слое представителей основных классов БАВ, присутствующих в ЛРС [аминокислоты, флавоноиды, дубильные вещества, простые сахара, аскорбиновая кислота, жирорастворимые витамины (ЖРВ)], было изучено значение основного фактора, влияющего на параметры эффективности хроматографического процесса – полярности элюента (*P*).

В качестве стандартных образцов для выявления закономерностей хроматографического поведения основных представителей различных групп БАВ использовались коммерчески доступные индивидуальные вещества: α-токоферол (≥ 97 %, ICN Biomedical, США), рутин (≥ 94 %, Sigma, США), ретинола ацетат (ФС 42-7811-97), эргокальциферол (ФСП 42-0008018000), β-каротин (ВФС 42-0008018000), танин, галловая кислота, кверцетин, простые сахара (рамноза, глюкоза, ксилоза, фруктоза), аскорбиновая кислота (АсК), аминокислоты (пролин, глицин, глутаминовая кислота, метионин, фенилаланин, аргинин, валин, лейцин) (≥ 98 %, ЗАО «Вектон», Россия). В работе использовали реактивы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», Россия), отвечающие требованиям соответствующей НД. В эксперименте использованы хроматографические пластины марки Sorbfil ПТСХ-АФ-А и ПТСХ-АФ-В высокоэффективные размером 10 × 10 см (тип сорбента: силикагель СТХ-1А, СТХ-1ВЭ; зернение: 5–17, 8–12 мкм; толщина слоя: 90–120, 80–100 мкм соответственно; связующее: силиказоль). Нанесение проб осуществлялось микрошприцами (МШ-1 и МШ-10, Россия).

Выбор проявителя, позволяющего получить стойкое окрашивание с разделяемой группой БАВ, осуществляли с учетом анализа литературных источников [1–13]. Зоны БАВ на хроматограммах обнаруживали способом опрыскивания хроматограмм раствором обнаруживающего реагента с помощью пульверизатора («spraying»).

Апробация разработанных теоретических подходов к разделению изучаемых групп БАВ, а также идентификация и количественное определение были проведены на ЛРС крапивы двудомной как вида – источника гидрофильных групп БАВ и ЛРС облепихи крушиновидной, содержащего обширный спектр соединений липофильной природы. В качестве объектов исследования использовали готовое измельченное сырье листьев крапивы двудомной (*Folia Urticae*), выпускаемое отечественным производителем, соответствующее требованиям нормативной документации, а также плоды облепихи крушиновидной (*Fructus Hippophaae rhamnoides*), собранные на территории

Воронежской области, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп в свежем и высушенном виде. Сушку плодов производили при температуре 60 °C до остаточной влажности не более 14 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор растворителей, различающихся как по силе, так и по селективности, очень велик [1–3]. Проведена работа по подбору элюентов для определения основных природных групп БАВ (на примере основных представителей) в тонком слое сорбента. В эксперименте для исследуемых БАВ изучено более двадцати типов элюирующих систем в широком диапазоне полярности и установлены зависимости величины R_f от полярности системы (рисунок 1, а–в). Изучены элюенты, предложенные в литературе [13–18], а также новые хроматографические системы.

При детальном исследовании влияния полярности системы на величину R_f для каждого отдельного БАВ был определен интервал значений полярности элюента, в котором наблюдалась линейная зависимость (рисунок 2, а–в). Обобщенные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. **Параметры установленных линейных зависимостей величины R_f БАВ от *P* системы (где $y = R_f$, а $x = P$)**

Table 1. **Parameters of the established linear dependences of the R_f value of the BAS on the *P* system (where $y = R_f$, and $x = P$)**

№	БАВ BAS	Диапазон линейности Linearity range	R^2	Уравнение линейной зависимости Linear equation	Диапазон *P* системы для получения оптимальных величин R_f System *P* range for optimum R_f values
БАВ липофильной природы *Lipophilic BAS*					
1	β-каротин β-carotene	0–2,0	0,9756	$y = 2,5383x + 0,1729$	0,05–0,17
2	Эргокальциферол Ergocalciferol	0,58–1,10	0,9701	$y = 1,0455x – 0,5100$	0,77–1,06
3	Ретинола ацетат Retinol acetate	0,73–1,10	0,9907	$y = 0,3880x – 0,0847$	0,20–1,10
4	α-токоферол α-tocopherol	0,40–1,10	0,9830	$y = 0,9647x – 0,2976$	0,62–0,93
БАВ гидрофильной природы *BAS of hydrophilic nature*					
5	Рутин Routine	4,90–6,30	0,9740	$y = 0,4762x – 2,1095$	5,06–5,69
6	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	4,0–4,70	0,9850	$y = 0,7524x – 3,0127$	4,40–4,80
7	Аргинин Arginine	3,90–8,01	0,9545	$y = 0,1293x – 0,5408$	6,50–8,82
8	Глицин Glycine	3,90–5,54	0,9243	$y = 0,3074x – 1,2072$	4,90–5,88
9	Глутаминовая кислота Glutamic acid	5,13–6,00	0,9615	$y = 0,6191x – 2,7941$	5,00–5,48
10	Валин Valin	3,90–5,27	0,9646	$y = 0,4669x – 1,8293$	4,56–5,20
11	Лейцин Leucine	3,90–5,27	0,9789	$y = 0,5433x – 2,1007$	4,42–4,97
12	Метионин Methionine	3,90–5,27	0,9817	$y = 0,4770x – 1,8580$	4,52–5,15
13	Пролин Proline	3,90–5,54	0,9056	$y = 0,2982x – 1,1963$	5,02–6,02
14	Фенилаланин Phenylalanine	3,90–5,27	0,9851	$y = 0,5243x – 2,0039$	4,39–4,97
15	Глюкоза Glucose	5,13–6,33	0,9616	$y = 0,2321x – 0,7789$	4,65–5,94
16	Ксилоза Xylosis	4,42–5,22	0,9727	$y = 0,0750x + 0,1409$	2,12–6,12
17	Рамноза Rhamnose	3,54–4,64	0,9937	$y = 0,4367x – 1,3736$	3,83–4,52
18	Галловая кислота Gallic acid	3,54–5,36	0,9777	$y = 0,0827x + 0,5407$	До 0,72
19	Кверцетин Quercetin	4,89–5,36	0,9529	$y = 0,8792x – 4,0492$	4,95–5,29

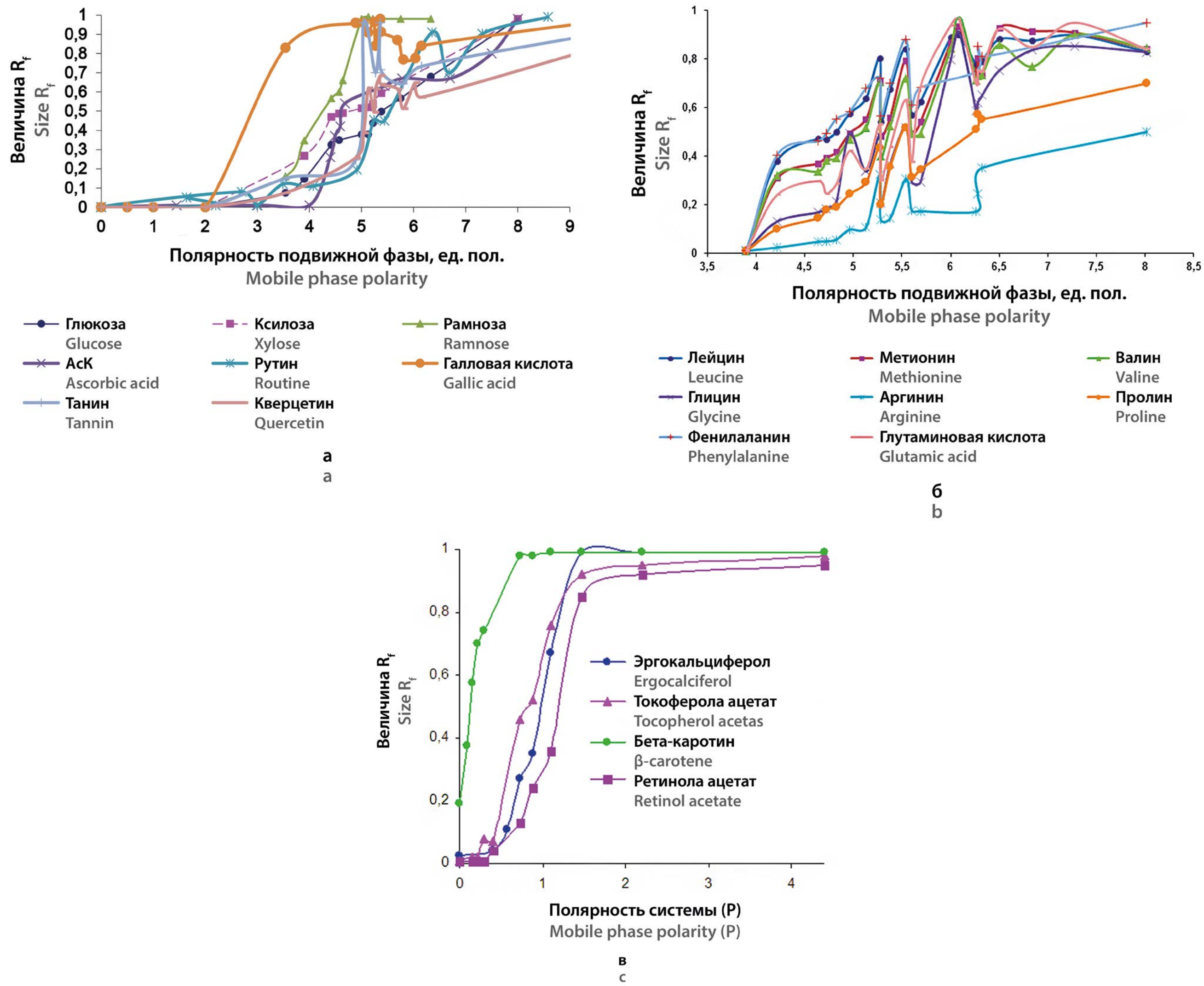


Рисунок 1. Вид зависимости величины R_f БАВ от полярности элюента:
а – простые сахара, полифенольные соединения, АсК; б – аминокислоты; в – ЖРВ

Figure 1. The type of dependence of the R_f value of BAS on the polarity of the eluent:
a – simple sugars, polyphenolic compounds, ascorbic acid; b – amino acids; c – fat-soluble vitamins

Таким образом, установлены закономерности элюирования и математические модели, описывающие хроматографическое поведение растительных БАВ в тонком слое сорбента (таблица 1). С помощью предложенных зависимостей можно подбирать различные системы для определения БАВ, чтобы величина R_f укладывалась в оптимальные значения, а также прогнозировать возможность разделения сложных многокомпонентных смесей при заданной величине полярности элюента.

По совокупности полученных результатов с позиций эффективности хроматографического процесса [высота, эквивалентная теоретической тарелке (H), и число теоретических тарелок (N), коэффициент распределения (K)] были выбраны и теоретически обоснованы оптимальные условия хроматографирования изучаемых БАВ в тонком слое сорбента: элюент, проявитель, сорбент, объем пробы, чувствительность определения, полярность системы. Обобщенные данные представлены в таблице 2.

Основные параметры, отражающие эффективность хроматографирования исследуемых БАВ методом ТСХ в системах, описанных в таблице 2, представлены в таблице 3.

Таким образом, проведенные исследования показали, что определение и разделение в тонком слое сорбента гидрофильных и липофильных БАВ ЛРС при совместном присутствии требует различных подходов и приемов. Предложенный алгоритм выбора подвижной фазы и приемов проведения хроматографического анализа БАВ ЛРС приведен на рисунке 3.

Для исследования качественного состава БАВ и достижения четкого разделения зон на хроматограммах разработанные ТСХ-методики с применением простого, фронтального или двумерного хроматографирования апробированы на изучаемом ЛРС. Результаты представлены в таблице 4.

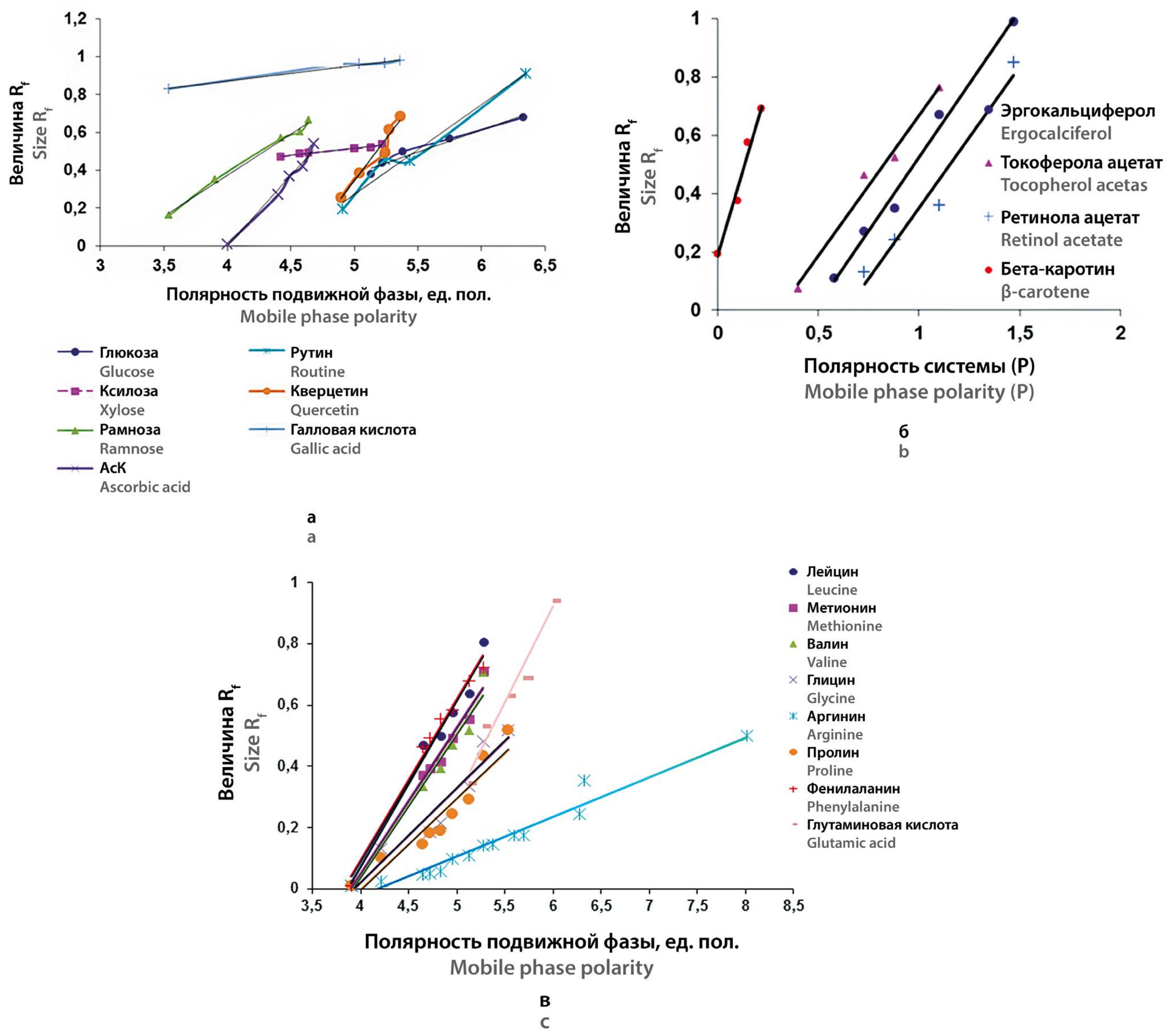


Рисунок 2. **Линейные зависимости величины R_f БАВ от значения полярности элюента:**
а – простые сахара, полифенольные соединения, АсК; б – ЖРВ; в – аминокислоты

Figure 2. **Linear dependences of the R_f value of BAS on the polarity of the eluent:**
a – simple sugars, polyphenolic compounds, ascorbic acid; b – fat-soluble vitamins; c – amino acids

Для проведения количественного определения БАВ в исследуемом ЛРС при совместном присутствии с применением различных вариаций разработанных ТСХ-методик на следующем этапе сразу же после проявления хроматографических зон на калибровочных хроматограммах с сериями стандартных растворов пластины сканируют и обрабатывают компьютерной программой Sorbfil Videodensitometer (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Установлены линейные зависимости между содержанием БАВ (*x*) и площадью хроматографической зоны (*y*) в диапазоне изучаемых концентраций. Разработанные методики количественной оценки данных ТСХ были апробированы на изучаемом ЛРС. Характеристики методик и результаты определения представлены в таблице 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенная в данной работе возможность теоретического подхода к выбору оптимальных условий хроматографического разделения различных групп БАВ растительного происхождения в тонком слое сорбента дает воспроизводимые результаты и позволяет с минимальными затратами решать поставленные задачи. Проведенные исследования, в зависимости от целей и объекта анализа, позволяют подбирать условия, в которых возможно определять отдельные БАВ в сложных многокомпонентных смесях без предварительного разделения на отдельные компоненты.

Таблица 2. Характеристики разработанных методик разделения и идентификации изучаемых БАВ в тонком слое сорбента

Table 2. Characteristics of the developed methods of separation and identification of the studied BAS in a thin layer of sorbent

№	БАВ BAS	Условия анализа Analysis conditions				
		Элюент Eluent	Детектирующий реагент Detection reagent	R_f	*P*	ПО, г Detection limit, g
	БАВ липофильной природы *Lipophilic BAS*					
1	β-каротин β-carotene	гексан : бензол (29:1) hexane : benzene (29:1)	–	0,38 ± 0,01	0,10	$1 \cdot 10^{-5}$
2	Эргокальциферол Ergocalciferol	гексан : хлороформ (4:1) hexane : chloroform (4:1)	5%-й спиртовый раствор ФМК 5 % alcohol solution of phosphoromolybdic acid	0,35 ± 0,01	0,88	$7 \cdot 10^{-9}$
3	Ретинола ацетат Retinol acetate	гексан : хлороформ (3:1) hexane : chloroform (3:1)	10%-й спиртовый раствор ФМК с конц. хлористоводородной кислотой (25:1) 10 % alcohol solution of phosphoromolybdic acid with concentrated hydrochloric acid (25:1)	0,36 ± 0,01	1,10	$1 \cdot 10^{-7}$
4	α-токоферол α-tocopherol	хлороформ chloroform	конц. азотная кислота concentrated nitric acid	0,59 ± 0,02	4,40	$1 \cdot 10^{-6}$
5	ЖРВ при совместном присутствии Fat solubile vitamins with joint presence	элюент 1 (высота пробега 8 см) – гексан : хлороформ (19:1); элюент 2 (высота пробега 6 см) – гексан : хлороформ (3:1) eluent 1 (run height 8 cm) – hexane : chloroform (19:1); eluent 2 (run height 6 cm) – hexane : chloroform (3:1)	5%-й спиртовый раствор ФМК 5 % alcohol solution phosphoromolybdic acid	–	элюент 1 – 0,22; элюент 2 – 1,10 eluent 1 – 0.22; eluent 2 – 1.10	–
	БАВ гидрофильной природы *BAS of hydrophilic nature*					
6	Рутин Routine	этилацетат : ледяная уксусная кислота : вода (7,5:1,5:1,5) ethylacetate : glacial acetic acid : water (7.5:1.5:1.5)	5%-й спиртовый раствор NaOH 5 % alcohol solution of NaOH	0,46 ± 0,01	5,24	$5 \cdot 10^{-7}$
7	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	этилацетат : ледяная уксусная кислота (85:15) ethylacetate : glacial acetic acid (85:15)	5%-й спиртовый раствор ФМК или 0,2%-й спиртовый раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия 5 % alcohol solution of phosphomolybdic acid or 0.2 % alcohol solution of 2.6-sodium dichlorophenolindophenolate	0,42 ± 0,01	4,59	$4 \cdot 10^{-7}$
8	Аргинин Arginine	*н*-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2) *n*-butanol : acetic acid : water (4:1:2)	1%-й спиртовый раствор нингидрина 1 % alcohol solution of ninhydrin	0,55 ± 0,02	5,13	$1 \cdot 10^{-8}$
9	Глицин Glycine			0,29 ± 0,02		$1 \cdot 10^{-8}$
10	Глутаминовая кислота Glutamic acid			0,68 ± 0,01		$1 \cdot 10^{-8}$
11	Валин Valin			0,11 ± 0,01		$5 \cdot 10^{-8}$
12	Лейцин Leucine			0,34 ± 0,01		$3 \cdot 10^{-8}$
13	Метионин Methionine			0,35 ± 0,01		$3 \cdot 10^{-8}$
14	Пролин Proline			0,52 ± 0,01		$10 \cdot 10^{-8}$
15	Фенилаланин Phenylalanine			0,64 ± 0,02		$3 \cdot 10^{-8}$
16	Глюкоза Glucose	*н*-бутанол : ледяная уксусная кислота : вода (4:1:2) *n*-butanol : glacial acetic acid : water (4:1:2)	сульфаниламид и *о*-фталевая кислота sulfanilamide and *o*-phthalic acid	0,29 ± 0,02	5,69	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$
17	Ксилоза Xylosis			0,45 ± 0,01		$2{,}5 \cdot 10^{-6}$
18	Рамноза Rhamnose			0,55 ± 0,02		$5 \cdot 10^{-6}$

Окончание таблицы 2

№	БАВ BAS	Условия анализа Analysis conditions				
		Элюент Eluent	Детектирующий реагент Detection reagent	R_f	*P*	ПО, г Detection limit, g
19	Галловая кислота Gallic acid	элюент 1 (высота пробега 9 см) – диэтиловый эфир : уксусная кислота : гексан : этилацетат (20:20:20:40); элюент 2 (высота пробега 7 см) – этилацетат : муравьиная кислота : уксусная кислота : вода (67:7,5:7,5:18) eluent 1 (run height 9 cm) – diethyl ether : acetic acid : hexane : ethyl acetate (20:20:20:40); eluent 2 (run height 7 cm) – ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water (67:7.5:7.5:18)	1%-й спиртовый раствор железо-аммонийных квасцов 1 % alcoholic solution of ammonium iron alum	элюент 1 – 0,83 ± 0,02 eluent 1 – 0.83 ± 0.02	элюент 1 – 3,54; элюент 2 – 9,68 eluent 1 – 3.54; eluent 2 – 9.68	$3 \cdot 10^{-7}$
20	Кверцетин Quercetin			элюент 1 – 0,08 ± 0,01; элюент 2 – 0,84 ± 0,02 eluent 1 – 0.08 ± 0.01; eluent 2 – 0.84 ± 0.02		$1 \cdot 10^{-6}$
21	Танин Tannin			элюент 1 – 0,15 ± 0,01; элюент 2 – 0,91 ± 0,01 eluent 1 – 0.15 ± 0.01; eluent 2 – 0.91 ± 0.01		$5{,}5 \cdot 10^{-7}$

Примечание. *P* – полярность системы, рассчитанная по Л. Снайдеру; ПО – предел обнаружения.

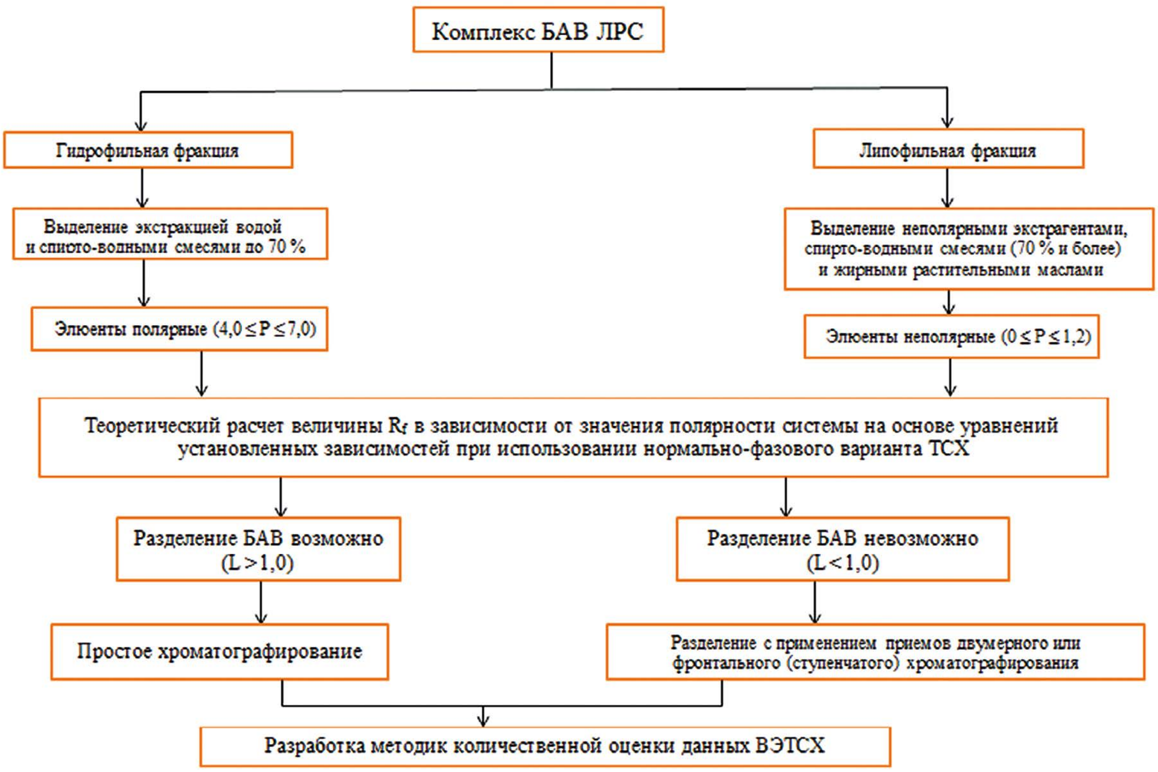


Рисунок 3. Алгоритм выбора подвижной фазы и приемов проведения хроматографического определения и разделения БАВ ЛРС (L – коэффициент селективности сорбции, показывающий эффективность разделения зон на хроматограммах в ТСХ)

Разработанные новые, простые в исполнении, экономически доступные, экспрессные методики разделения, идентификации и количественного определения БАВ с применением различных вариаций метода ВЭТСХ могут быть также использованы для стандартизации и оценки качества других видов ЛРС (апробированы на примере сырья крапивы двудомной и облепихи крушиновидной), фитопрепаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения.

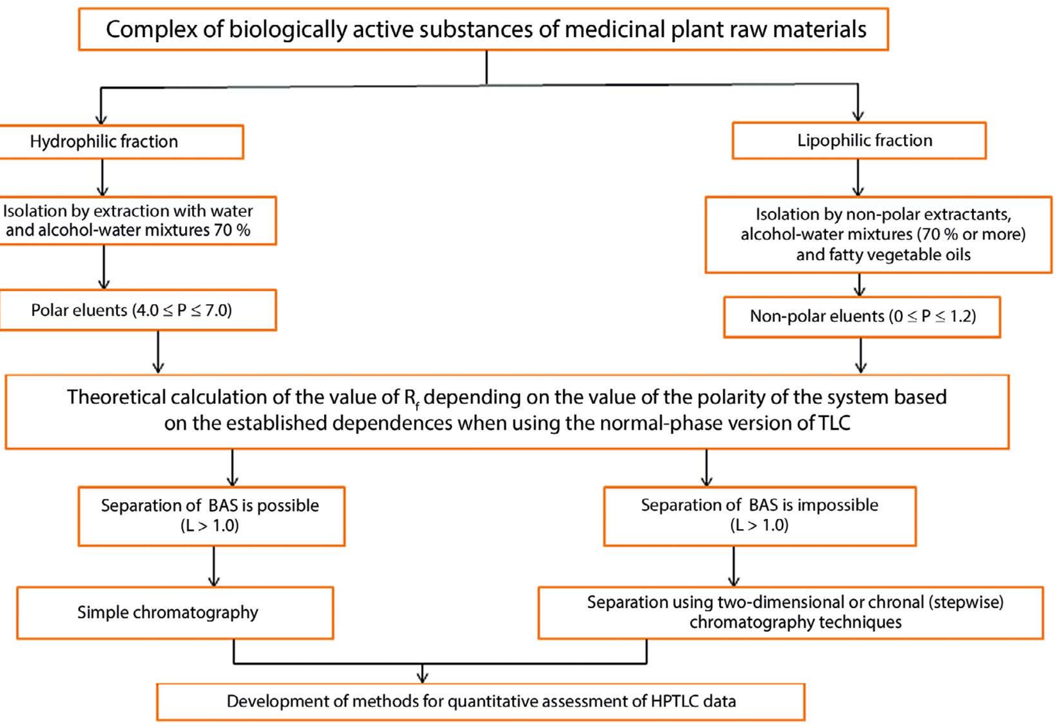


Figure 3. Algorithm for the selection of the mobile phase and methods for the chromatographic determination and separation of BAS of MPM (L is the coefficient of selectivity of sorption, showing the efficiency of separation of zones on chromatograms in TLC)

Таблица 3. Параметры эффективности хроматографирования исследуемых БАВ методом ТСХ

Table 3. Parameters of the efficiency of chromatography of the studied BAS by TLC

№	БАВ BAS	H, мм	N	K
1	β-каротин β-carotene	0,78	108,97	0,38 ± 0,01
2	α-токоферол α-tocopherol	0,55	156,00	0,69 ± 0,02
3	Рутин Routine	0,71	100,80	0,46 ± 0,01
4	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	0,10	767,00	0,42 ± 0,01
5	Глюкоза Glucose	0,70	127,14	0,29 ± 0,02
6	Ксилоза Xylosis	0,42	211,90	0,45 ± 0,01
7	Рамноза Rhamnose	0,35	254,29	0,55 ± 0,02
8	Аргинин Arginine	0,44	179,55	0,11 ± 0,01
9	Глицин Glycine	0,89	87,64	0,34 ± 0,01
10	Глутаминовая кислота Glutamic acid	0,36	186,11	0,35 ± 0,01
11	Валин Valine	0,37	210,81	0,52 ± 0,01
12	Лейцин Leucine	0,17	458,82	0,64 ± 0,02
13	Метионин Methionine	0,35	222,86	0,55 ± 0,02
14	Пролин Proline	0,30	256,67	0,29 ± 0,02
15	Фенилаланин Phenylalanine	0,65	116,92	0,68 ± 0,01

ЛИТЕРАТУРА

1. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Мир; 1999. 405 с.
2. Красиков В. Д. Основы планарной хроматографии. СПб.: Химиздат; 2005. С. 45–52.
3. Мелькина О., Манухов И., Антонова С., Пушков А., Малахова И., Красиков В., Яненко А., Синевкий С. Определение L-гомосерина в культуральных жидкостях: экспресс-метод на основе ВЭТСХ. *Аналитика*. 2013;6(13):28–34.
4. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative thin-layer chromatography. Heidelberg: *Springer*. 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-10729-0.
5. Trineeva O. V., Safonova E. F., Sinkevich A. V., Slivkin A. I. Assay of amino acids in medicinal plants by TLC (using stinging nettle leaves and common sea buckthorn fruits as examples). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(5):323–328. DOI: 10.1007/s11094-015-1278-9.
6. Kagan I. A., Flythe M. D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;85:51411. DOI: 10.3791/51411.
7. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676–2683. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
8. Zaushintsena A., Milentyeva I., Babich O., Noskova S., Kiseleva T., Popova D., Bakin I., Lukin A. Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (Echinacea Purpurea L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(1):84–92. DOI: 10.21603/2308-4057-2019-1-84-92.
9. Tomczyk M., Bazylko A., Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of Potentilla species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*. 2009;21(2):174–179. DOI: 10.1002/pca.1174.
10. Trifonova O. V., Evdokimova O. V., Sadchikova N. P., Matyushin A. A. Biologically active substances in Bidens tripartita L. J. changes in quantitative and qualitative composition of during granulation process. *Pharm. Sci. & Res*. 2018;10(11):2872–2875.

Таблица 4. Идентификация зон БАВ на хроматограммах извлечений из ЛРС

Table 4. Identification of BAS zones on chromatograms of extracts from MPM

№	БАВ BAS	Объекты исследования Research objects		
		Листья крапивы двудомной Nettle leaves	Плоды облепихи крушиновидной высушенные Dried sea buckthorn fruits	Плоды облепихи крушиновидной свежие Fresh sea buckthorn fruits
1	Органические кислоты Organic acids	Щавелевая, винная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, ascorbic acid	Щавелевая, винная, лимонная, яблочная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, citric, malic, ascorbic acid	Щавелевая, винная, яблочная, аскорбиновая кислота Oxalic, tartaric, malic, ascorbic acid
2	Флавоноиды Flavonoids	Рутин, кверцетин Rutin, quercetin	Рутин, гиперозид, кверцетин Rutin, hyperoside, quercetin	
3	Аминокислоты Amino acids	Аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота, валин, лейцин, фенилаланин Arginine, proline, glycine, glutamic acid, valine, leucine, phenylalanine	Аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин Arginine, proline, glycine, glutamic acid, leucine, phenylalanine	Пролин, глицин, глутаминовая кислота, лейцин Proline, glycine, glutamic acid, leucine
4	Дубильные вещества Tannins	Танин, галловая кислота Tannin, gallic acid	Галловая кислота Gallic acid	
5	Простые сахара Simple sugars	Глюкоза, ксилоза, рамноза Glucose, xylose, rhamnose		

Таблица 5. Параметры разработанных методик ТСХ для идентификации и количественного определения БАВ в ЛРС (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

Table 5. Parameters of the developed TLC methods for identification and quantitative determination of biologically active substances in medicinal product (in terms of absolutely dry raw materials)

№	БАВ BAS	Диапазон линейности, мг/мл Linearity range mg/ml	R^2	Уравнение прямой Linear equation	Результаты определения БАВ, % BAS determination results, %	
					Листья крапивы двудомной Nettle leaves	Плоды облепихи крушиновидной высушенные Dried sea buckthorn fruits
1	Аскорбиновая кислота Ascorbic acid	1,5–4,5	0,9941	$y = 9233,6x - 1550,1$	0,053 ± 0,015	0,047 ± 0,001
2	Глутаминовая кислота Glutamic acid	0,5–3,5	0,9707	$y = 18190x + 13560$	0,011 ± 0,001	0,330 ± 0,036
3	Кверцетин Quercetin	1,0–6,0	0,9916	$y = 3,6734x + 1,1792$	0,643 ± 0,040	–
4	Танин Tannin	0,5–4,5	0,9721	$y = 4,4805x + 0,7287$	0,724 ± 0,016	–
		5,0–7,0	0,9531	$y = 6,0083x - 0,1537$		
5	Галловая кислота Gallic acid	0,3–1,5	0,9660	$y = 16,601x - 5,3268$	0,579 ± 0,056	0,041 ± 0,001
		1,5–4,0	0,9154	$y = 4,8778x + 13,128$		
6	Глюкоза Glucose	15,0–35,0	0,9947	$y = 16,327x - 158,66$	14,070 ± 1,263	35,569 ± 3,446
7	Ксилоза Xylose	15,0–30,0	0,9744	$y = 3,7854x + 23,337$	0,273 ± 0,056	Менее 0,05 %
8	Рамноза Ramnose	10,0–30,0	0,9734	$y = 3,3692x + 8,744$	2,315 ± 0,131	1,705 ± 0,098

11. Ramu B., Chittela K. B. High performance thin layer chromatography and its role pharmaceutical industry: Review. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018;5(3):29–34.
12. Creţu G., Morlock G. E., Grosu A. R., Nechifor A. C. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18(5):8657–8665.
13. Тринеева О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе. Дисс. ... д-р фарм. наук. Москва; 2017. 441 с. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Ссылка активна на 26.03.2021.
14. Rybakova O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determining tocopherols by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(8):471–474. DOI: 10.1007/s11094-008-0152-4.
15. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Quantitative determination of rutin by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):134–138. DOI: 10.1007/s11094-014-1064-0.
16. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Thin-layer chromatography characteristics of β-carotene. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):321–323. DOI: 10.1007/s11094-012-0790-4.
17. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D_2, and E and β-carotene by gradient thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(2):120–125. DOI: 10.1007/s11094-016-1408-z.
18. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Development of a technique for codetermination of tannin and gallic acid in medicinal plant raw material. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):361–367. DOI: 10.1007/s11094-019-02006-y.

REFERENCES

1. Gejss F. *Osnovy tonkoslojnoj hromatografii* [Fundamentals of thin layer chromatography]. Moscow: Mir; 1999. 405 p. (In Russ.)
2. Krasikov V. D. Osnovy planarnoj hromatografii [Fundamentals of Planar Chromatography]. St. Petersburg: Himizdat; 2005. P. 45–52. (In Russ.)
3. Melkina O., Manukhov I., Antonova S., Pushkov A., Malakhova I., Krasikov V., Yanenko A., Sineokii S. *Opredelenie L-gomoserina v kul'tural'nykh zhidkostyakh: ekspress-metod na osnove VETSKh* [Determination of L-Homoserine in Cultural Broths Using Hptlc As an Express Method]. *Analitika = Analytics*. 2013;6(13):28–34. (In Russ.)
4. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative thin-layer chromatography. Heidelberg: *Springer*. 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-10729-0.
5. Trineeva O. V., Safonova E. F., Sinkevich A. V., Slivkin A. I. Assay of amino acids in medicinal plants by TLC (using stinging nettle leaves and common sea buckthorn fruits as examples). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(5):323–328. DOI: 10.1007/s11094-015-1278-9.
6. Kagan I. A., Flythe M. D. Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of Visualized Experiments*. 2014;85:51411. DOI: 10.3791/51411.
7. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(19):2676–2683. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
8. Zaushintsena A., Milentyeva I., Babich O., Noskova S., Kiseleva T., Popova D., Bakin I., Lukin A. Quantitative and qualitative profile of biologically active substances extracted from purple echinacea (Echinacea Purpurea L.) growing in the Kemerovo region: functional foods application. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(1):84–92. DOI: 10.21603/2308-4057-2019-1-84-92.
9. Tomczyk M., Bazylko A., Staszewska A. Determination of polyphenolics in extracts of Potentilla species by high-performance thin-layer chromatography photodensitometry method. *Phytochemical Analysis*. 2009;21(2):174–179. DOI: 10.1002/pca.1174.
10. Trifonova O. V., Evdokimova O. V., Sadchikova N. P., Matyushin A. A. Biologically active substances in Bidens tripartita L. J. changes in quantitative and qualitative composition of during granulation process. *Pharm. Sci. & Res*. 2018;10(11):2872–2875.
11. Ramu B., Chittela K. B. High performance thin layer chromatography and its role pharmaceutical industry: Review. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2018;5(3):29–34.
12. Creţu G., Morlock G. E., Grosu A. R., Nechifor A. C. A high-performance thin-layer chromatographic method for chlorogenic acid and hyperoside determination from berry extracts. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013;18(5):8657–8665.
13. Trineeva O. V. *Teoreticheskie i metodologicheskie podkhody k standartizatsii i otsenke kachestva lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya i maslyanykh ekstraktov na ego osnove* [Theoretical and methodological approaches to standardization and quality assessment of medicinal plant raw materials and oil extracts based on it] [dissertation]. Moscow; 2017. 441 p. Available at: https://www.dissercat.com/content/teoreticheskie-i-metodologicheskie-podkhody-k-standartizatsii-i-otsenke-kachestva-lekarstven. Accessed: 26.03.2021. (In Russ.)
14. Rybakova O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Determining tocopherols by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2008;42(8):471–474. DOI: 10.1007/s11094-008-0152-4.
15. Trineeva O. V., Safonova I. I., Safonova E. F., Slivkin A. I. Quantitative determination of rutin by thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;48(2):134–138. DOI: 10.1007/s11094-014-1064-0.
16. Checheta O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Thin-layer chromatography characteristics of β-carotene. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46(5):321–323. DOI: 10.1007/s11094-012-0790-4.
17. Trineeva O. V., Safonova E. F., Slivkin A. I. Separation and determination of a mixture of fat-soluble vitamins A, D_2, and E and β-carotene by gradient thin-layer chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(2):120–125. DOI: 10.1007/s11094-016-1408-z.
18. Trineeva O. V., Slivkin A. I. Development of a technique for codetermination of tannin and gallic acid in medicinal plant raw material. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(4):361–367. DOI: 10.1007/s11094-019-02006-y.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86
УДК 54.061:54.062:615.322

Check for updates

Оригинальная статья / Research article

Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L.

А. О. Понкратова[1]*, А. К. Уэйли[1], А. А. Орлова[1], С. Н. Смирнов[2], Е. Б. Серебряков[2], В. Г. Лужанин[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] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

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

ORCID: А. О. Понкратова – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; А. К. Уэйли – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; А. А. Орлова – https://orcid.org/0000-0002-7836-5785; С. Н. Смирнов – https://orcid.org/0000-0003-2042-337X; Е. Б. Серебряков – https://orcid.org/0000-0002-1021-6871; В. Г. Лужанин – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027.

Статья поступила: 04.03.2021 **Статья принята в печать:** 13.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются широко распространенной группой заболеваний по всему миру, ежегодно поражающей более 150 миллионов человек. У порядка 30 % пациентов, перенесших первичную инфекцию, ИМП переходит в хроническую форму. Лекарственные препараты растительного происхождения наряду с синтетическими диуретиками и антибиотиками широко применяются для профилактики и лечения ИМП, а поиск и выделение индивидуальных веществ из растительного сырья, обладающих фармакологическим потенциалом, является актуальным. Настоящее исследование посвящено выделению индивидуальных соединений, относящихся к классу проантоцианидинов, из надземной части водяники черной (*Empetrum nigrum* L.).

Цель. Разработать методики выделения индивидуальных проантоцианидинов из надземной части *Empetrum nigrum* и установить химическую структуру выделенных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа.

Материалы и методы. Побеги *Empetrum nigrum* были собраны в районе питомника лекарственных растений Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета (далее – СПХФУ) (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года. Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, а также методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) на приборе CAMAG (Швейцария). Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективностью, а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartlina (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структура выделенных индивидуальных соединений устанавливалась методами 1D и 2D ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Результаты и обсуждение. С помощью разработанных методик из побегов *Empetrum nigrum* выделено три индивидуальных соединения, относящихся к классу проантоцианидинов типа А. Согласно данным ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, соединение **1** представляет собой эпикатехин-(2β → O → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → O → 5, 4β → 6). Соединения **2** и **3** представляют собой эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-эпикатехин (процианидин А2) и эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-катехин (процианидин А1) соответственно. Все индивидуальные соединения (**1-3**) обнаружены и выделены из *Empetrum nigrum* впервые.

Заключение. В результате исследования из надземной части *Empetrum nigrum* были выделены три индивидуальных соединения (проантоцианидины типа А), которые ранее в *Empetrum nigrum* не были обнаружены. Предполагается последующее исследование биологической активности выделенных соединений.

Ключевые слова: водяника черная, *Empetrum nigrum*, конденсированные танины, проантоцианидины типа А, вторичные метаболиты

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. О. Понкратова, А. А. Орлова 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.

Для цитирования: Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86

Isolation and Structure Elucidation of Three Dimeric A-type Proanthocyanidins from *Empetrum Nigrum* L.

Anastasiia O. Ponkratova[1]*, Andrei K. Whaley[1], Anastasia A. Orlova[1], Sergey N. Smirnov[2], Evgeny B. Serebryakov[2], Vladimir G. Luzhanin[1]

[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 emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia

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

ORCID: Anastasiia O. Ponkratova – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Andrei K. Whaley – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924;
Anastasia A. Orlova – https://orcid.org/0000-0002-7836-5785; Sergey N. Smirnov – https://orcid.org/0000-0003-2042-337X;
Evgeny B. Serebryakov – https://orcid.org/0000-0002-1021-6871; Vladimir G. Luzhanin – https://orcid.org/0000-0002-6312-2027.

Received: 04.03.2021 **Revised:** 13.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Urinary tract infections are a common group of diseases worldwide, affecting more than 150 million people every year. In about 30 % of patients with initial infection, UTI becomes chronic. Herbal medicines, along with synthetic diuretics and antibiotics, are widely used for the prevention and treatment of UTIs, which makes the search and isolation of various substances from plant materials an important task. The present study is devoted to the isolation of compounds belonging to the class of proanthocyanidins from the aerial part of the black crowberry (*Empetrum nigrum* L.).

Aim. Method development for the isolation of individual dimeric type A proanthocyanidins from the aerial part of *Empetrum nigrum* and the elucidation of their chemical structure using modern physicochemical methods of analysis.

Materials and methods. Shoots of *Empetrum nigrum* were collected next to the Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University Nursery Garden of Medicinal Plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km) in August 2019. Fraction analysis was performed through analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Prominence LC-20 (Shimadzu corp., Japan) equipped with a SPD-M20A diode-array detector, as well as by high performance thin layer chromatography (HPTLC) using a CAMAG HPTLC system (Switzerland). The isolation of compounds was carried out by open column chromatography using sorbents with different selectivity, as well as by preparative HPLC using a Smartline system (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structures of the isolated compounds were established by 1D and 2D NMR experiments (Bruker Avance III 400 MHz, Germany), as well as high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Germany).

Results and discussion. Using the developed methods, from the *Empetrum nigrum* shoots we managed to isolate and characterised three individual compounds belonging to the class of A-type proanthocyanidins. According to NMR and mass spectrometry data, compound **1** is epicatechin-(2β → O → 5, 4β → 6)-epicatechin, with an extremely rare type of intermonomer bond (2β → O → 5, 4β → 6). Compounds **2** and **3** are epicatechin-(2β → O → 7, 4β → 8)-epicatechin (procyanidin A2) and epicatechin-(2β → O → 7, 4β → 8)-catechin (procyanidin A1), respectively. All individual compounds (**1-3**) were found and isolated from *Empetrum nigrum* for the first time.

Conclusion. As a result of the research, three individual compounds (A-type proanthocyanidins) were isolated from the aerial part of *Empetrum nigrum*. All individual compounds (**1-3**) were found and isolated from *Empetrum nigrum* for the first time. Future assessment of the isolated compounds biological activity is presumed.

Keywords: black crowberry, *Empetrum nigrum*, condensed tannins, A-type proanthocyanidins, secondary metabolites

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anastasiia O. Ponkratova, Anastasia A. Orlova performed the experimental part. Sergey N. Smirnov preformed the NMR experiments. Evgeny B. Serebyrakov preformed the HR-ESI-MS experiments. Andrei K. Whaley preformed processing of the NMR-experiments and HR-ESI-MS results. Vladimir G. Luzhanin oversaw of the research. All authors took part in the discussion of the results.

For citation: Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86

ВВЕДЕНИЕ

Водяника черная (*Empetrum nigrum* L.) представляет собой вечнозеленый кустарничек из семейства *Ericaceae*. *E. nigrum* произрастает преимущественно в Северном полушарии, включая северные европейские страны (Скандинавские страны, Великобритания), северную часть России, Японию и Китай, Гренландию и северо-восток Канады. К типичным местообитаниям данного вида относятся сфагновые болота, мохово-лишайниковые тундры и заболачиваемые хвойные леса [1]. Разнообразие вторичных метаболитов водяники черной обеспечивает широкий диапазон применения в медицине в качестве противосудорожного, церебропротективного, антиоксидантного, диуретического, противомикробного, противогрибкового [2–4] и противовоспалительного [5] средства, а также для лечения туберкулеза [6] и диареи [7]. В предыдущих фитохимических исследованиях сообщалось об обнаружении и выделении различных групп соединений, включая флавоноиды [8], бибензилы [9, 10], 9,10-дигидрофенантрены, халконы и дигидрохалконы [9, 11], а также проантоцианидины [12].

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются одними из наиболее часто встречаемых инфекций в клинической практике во всем мире. Данная группа заболеваний ежегодно выявляется у более 150 миллионов человек [13]. У порядка 30 % пациентов, перенесших первичную инфекцию, ИМП приобретает хронический характер. Большое количество побочных эффектов значительно ограничивает применение антибиотиков и диуретиков [14]. Лекарственные препараты растительного происхождения широко применяются для профилактики и лечения ИМП, а поиск и выделение индивидуальных веществ из растительного сырья, обладающих фармакологическим потенциалом, является актуальным [15]. Установлено, что проантоцианидины (конденсированные танины) типа А проявляют бактериальную антиадгезионную активность как в отношении чувствительных к антибиотикам, так и в устойчивых штаммов уропатогенных бактерий [16, 17]. Наряду с этим отмечается мочегонный эффект проантоцианидинов и их способность снижать уровень мочевой кислоты в сыворотке крови (антигиперурикемическая активность), вследствие чего проантоцианидины могут использоваться для лечения подагры и мочекаменной болезни [18]. Также установлено, что проантоцианидины проявляют иммуностимулирующую, противовирусную [19], противомикробную [20] и противовоспалительную [21] активности. В связи с этим выделение индивидуальных соединений, относящихся к группе проантоцианидинов, является актуальным, так как данные соединения могут являться потенциальными лекарственными кандидатами для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний мочевыделительной системы. Ранее коллективом авторов также было выделено семь индивидуальных соединений из растений, обладающих диуретической активностью [22].

Таким образом, **целью настоящего исследования** стала разработка методики выделения индивидуальных проантоцианидинов из надземной части *Empetrum nigrum* и установление химической структуры выделенных соединений с использованием современных физико-химических методов анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Побеги *Empetrum nigrum* были собраны в районе питомника лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км) в августе 2019 года.

Анализ фракций проводили методом аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенном диодно-матричным детектором, при 235 и 254 нм. Применялась хроматографическая колонка SUPELCOSIL LC-18 (25 см × 4,6 мм) с размером частиц 5 мкм. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Температура анализа – 40 °С. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1 % (с $H_2O:CH_3CN$ 5:95 до $H_2O:CH_3CN$ 0:100, по объему). Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) выполнялась на приборе CAMAG (Швейцария) с использованием пластин для ВЭТСХ Merck HPTLC Silica gel 60 F254 plate (4–8 µm).

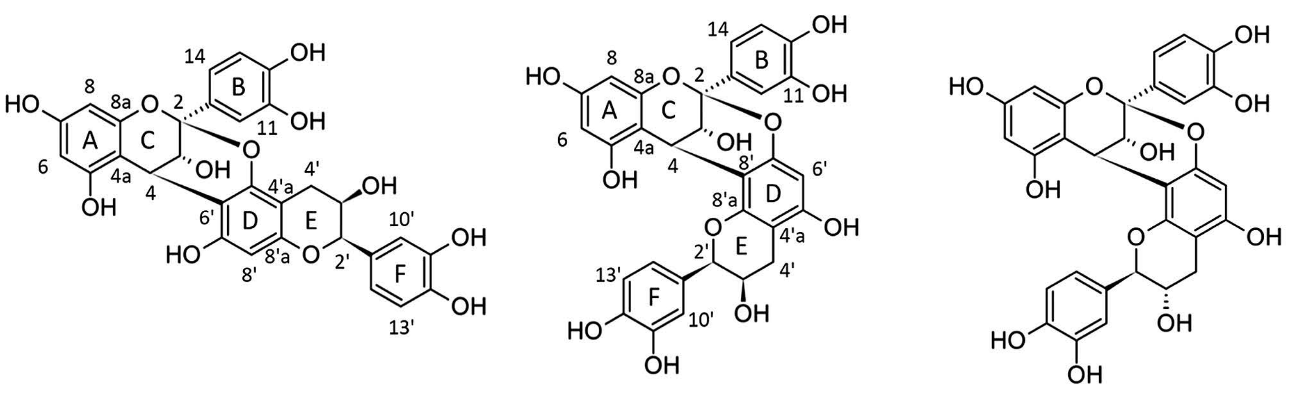
Выделение индивидуальных соединений осуществлялось методом колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности – Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония) и Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Швеция), а также методом препаративной ВЭЖХ на приборе Smartlina (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Применялась препаративная хроматографическая колонка Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) 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).

Выделение индивидуальных соединений проводилось на кафедре фармакогнозии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета, ЯМР-спектроскопическое и масс-спектрометрическое исследования выделенных соединений проводились на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате настоящего исследования из надземной части *Empetrum nigrum* были выделены и охарактеризованы три индивидуальных соединения, относящихся к группе проантоцианидинов типа А (**1**-**3**) (рисунок 1).



1 2 3

Рисунок 1. **Структуры соединений 1-3**

Figure 1. **Structures of compounds 1-3**

Перед экстракцией сырье подвергалось воздушно-теневой сушке, измельчалось и просеивалось через сито с диаметром отверстий 1 мм. 744 грамма измельченного сырья подвергалось многократной экстракции 96%-м этиловым спиртом (EtOH) (3150 мл) при комнатной температуре с использованием механической мешалки (Heidolph, Германия). Экстракция проводилась до того момента, пока полученный экстракт не становился бледным по сравнению с первоначальным. Все полученные спиртовые экстракты объединялись и выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до объема 500 мл. К 500 мл экстракта добавляли 100 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую жидкостно-жидкостную (ЖЖ) экстракцию с равными объемом *н*-гексана. После чего к водно-спиртовому остатку добавляли 300 мл воды очищенной и проводили исчерпывающую ЖЖ экстракцию с равным объемом дихлорметана (ДХМ). В заключение проводили ЖЖ экстракцию водно-спиртового остатка с равным объемом бутанола.

Бутанольную подфракцию выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 100 мл, после чего загружали на открытую стеклянную колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP-20. 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). Собранные фракции анализировались методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 10 мл. Фракция, содержащая целевые соединения, загружалась на открытую колонку, заполненную сорбентом Sephadex LH-20, и подвергалась изократическому элюированию 96%-м EtOH. Полученные фракции анализировались методом ВЭТСХ с целью выявления фракций со схожими компонентами. Фракции, которые имели пятна с одинаковыми факторами удерживания (R_f) и окраской, – объединялись. Объединенные фракции выпаривались на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до объема 10 мл. Фракция, содержащая танины, подвергалась хроматографическому разделению на препаративном высокоэффективном жидкостном хроматографе, в результате чего были выделены: соединение **1** (m = 4,36 мг, t_R = 21,784 мин); соединение **2** (m = 8,12 мг, t_R = 18,893 мин); соединение **3** (m = 7,54 мг, t_R = 20,759 мин).

Соединения **1-3** представляют собой белые кристаллические вещества. УФ-спектр соединений имеет один максимум поглощения при 278 нм. Во всех спектрах HR-ESI-MS отображает пик молекулярных ионов $[M + H]^+$ при m/z 577,1341 (расч. 577,1346), что соответствует молекулярной формуле $C_{30}H_{25}O_{12}$. Из этих данных следует, что соединения **1-3** являются изомерами.

В ^{1}H и COSY ЯМР-спектрах соединения **1** присутствуют три ароматические спиновые системы: АМ (кольцо А), образованная 6-Н (δН 6.05 (д, 2.0 Гц) и 8-Н (δН 5.97 (д, 2.0 Гц)); АВХ (кольцо В), образованная 10-Н (δН 7.04 (д, 1.9 Гц), 13-Н (δН 6.78 (д, 8.1 Гц)) и 14-Н (δН 6.84 (дд 8.1, 1.9 Гц)) и А'В'Х' (кольцо Е), образованная 10'-Н (δН 6.82 (д, 1.7 Гц)), 13'-Н (δН 6.69 (д, 8.1 Гц)) и 14'-Н (δН 6.59 (дд, 8.1, 1.7 Гц)). Синглет 8'-Н протона кольца D обнаруживался при δН 6.09. Также имеются две алифатические спиновые системы – одна из них в кольце С, состоящая из протонов Н-3 (δН 3.85 (т, 4.2, 3.1 Гц)), Н-4 (δН 4.08 (д, 3.1 Гц) и протона гидроксильной группы 3-ОН (δН 5.53 (д, 4.2 Гц)). Вторая алифатическая спиновая система наблюдалась в кольце F и состоит из протонов 2'-Н (δН 4.70, уш. с.), 3'-Н (δН 3.96, м), 4'α-Н (δН 2.81 (дд, 17.1, 3.2 Гц)), 4'β-Н (2.45, м) и протона гидроксильной группы 3'-ОН (δН 4.70 (д, 5.0 Гц)). Указанные данные свидетельствуют о том, что соединение **1** является димером, состоящим из остатков эпикатехина и катехина.

^{1}Н ЯМР-спектр соединения **1** также содержал синглеты семи фенольных ОН протонов, отнесенных к положениям 5-ОН (δН 9.39, с), 7-ОН (δН 9.51, с), 11-ОН (δН 9.08, с), 12-ОН (δН 9.21, с), 7'-ОН (δН 9.77, с), 11'-ОН (δН 8.90, с),12'-ОН (δН 8.98, с) через корреляции NOESY. Сигналы протонов двух фенольных гидроксилов в положениях 5 и 7' были в одинаковой степени уширены в сравнении с остальными, что указывает на наличие процесса обмена протонами между ними.

NOESY-корреляции протонов 4'α-Н и 4'β-Н кольца F с ароматическими протонами 10-Н и 14-Н кольца В наряду с NOESY корреляциями ароматического протона 8'-Н с протонами фенольных гидроксилов в положениях 5, 7' подтверждают наличие системы 2β → O → 5, 4β → 6 связей между остатком эпикатехина и катехина (рисунок 2). Факт уширения пика фенольной группы ОН в положениях 5 и 7 дополнительно подтверждает предложенную структуру. Таким образом, в результате анализа ЯМР- и масс-спектров данное соединение было идентифицировано как димерный процианидин – эпикатехин-(2β → O → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → O → 5, 4β → 6), ранее выделенное только из бобов какао [23].

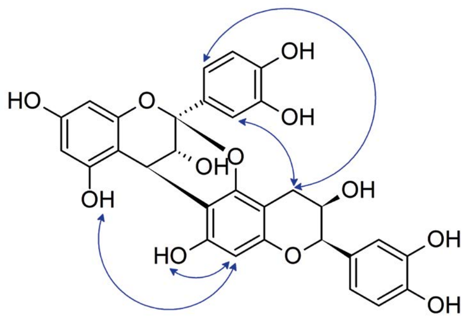


Рисунок 2. Ключевые NOESY-корреляции для соединения 1

Figure 2. Key NOESY correlations of compound 1

В ^{1}H и COSY ЯМР-спектрах соединения **2** наблюдались три ароматические спиновые системы: AM (кольцо А), образованная 6-H (δH 6.03 (д, 2.0 Гц) и 8-H (δH 5.92 (д, 2.0 Гц)); ABX (кольцо B), образованная 10-H (δH 6.96, уш. с.), 13-H (δH 6.78, м) и 14-H (δH 6.78, м) и A’B’X’ (кольцо E), образованная 10’-H (δH 7.18 (д, 1.2 Гц)), 13’-H (δH 6.73 (д, 8.5 Гц)) и 14’-H (δH 6.81 (дд, 8.5, 1.2 Гц)). Синглет 6’-H протона кольца D обнаруживался при δH 6.12. Присутствуют также две алифатические спиновые системы – одна из них в кольце С, состоящая из протонов H-3 (δH 3.77 (т, 4.0, 2.8 Гц)), H-4 (δH 4.26 (д, 2.8 Гц) и протона гидроксильной группы 3-OH (δH 5.22 (д, 4.0 Гц)); вторая алифатическая спиновая система наблюдалась в кольце F и состоит из протонов 2’-H (δH 4.74, уш. с.), 3’-H (δH 3.78, дд, 4.1, 4.0), 4’α -H (δH 2.70 (дд, 17.3, 4.0 Гц)), 4’β -H (2.53, м) и протона гидроксильной группы 3’-OH (δH 4.65 (д, 4.1 Гц)). Указанные данные свидетельствуют о том, что соединение **2** (по аналогии с соединением **1**) является димером, состоящим из остатков эпикатехина.

^{1}H ЯМР-спектр соединения **2** содержал синглеты протонов семи фенольных гидроксилов, отнесенных к положениям 5-OH (δH 8.59, с), 7-OH (δH 9.36, с), 11-OH (δH 9.04, с), 12-OH (δH 9.15, с), 5’-OH (δH 9.66, с), 11’-OH (δH 9.01, с),12’-OH (δH 8.86, с) через корреляции NOESY.

HMBC-корреляции от 4α-H до 7’-C (δC 150.6), 8’-C (δC 106.0) и 8а’-C (δC 151.5) подтвердили наличие (2β → O → 7, 4β → 8) связи между субъединицами. Таким образом, в результате анализа ЯМР- и масс-спектров данное соединение было идентифицировано как процианидин А2 – эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-эпикатехин (рисунок 3).

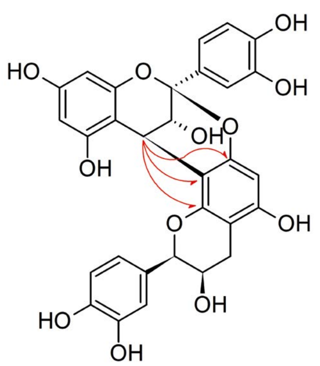


Рисунок 3. Ключевые HMBC-корреляции для соединения 2

Figure 3. Key HMBC correlations of compound 2

ЯМР-спектры соединения **3** практически полностью совпадали с ЯМР-спектрами соединения **2**. Единственную отличительную черту составляли протоны кольца F – 2’-H (δH 4.42 (д, 8.3 Гц)), 3’-H (δH 3,67, м), 4’α-H (δH 2.72 (дд, 16.2, 6.0 Гц)) и 4’β-H (δH 2.37 (дд, 16.2, 8.7 Гц). На основании констант спин-спинового взаимодействия и литературных данных было установлено, что соединение **3** представляет собой процианидин А1 – эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-катехин [24].

ЯМР-спектры соединений **1-3** представлены в таблице 1.

Таблица 1. Данные ЯМР соединений 1-3

Table 1. NMR data of compounds 1-3

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2		Соединение 3 Compound 3
	δH (*J* в Гц) (δH (*J*, Hz)	δH (*J* в Гц) (δH (*J*, Hz)	δC	δH (*J* в Гц) (δH (*J*, Hz)
2			98.7	
3	3.85 (т, 4.2, 3.1) 3.85 (t, 4.2, 3.1)	3.77 (дд, 2.8, 4.0) 3.77 (dd, 2.8, 4.0)	66.6	3.75 (т, 4.1, 3.0) 3.75 (t, 4.1, 3.0)
4	4.08 (д, 3.1 Hz) 4.08 (d, 3.1 Hz)	4.26 (д, 2.8) 4.26 (d, 2.8)	27.9	4.17 (д, 3.0) 4.17 (d, 3.0)
4a			102.7	
5			156.6	
6	6.05 (д, 2.0) 6.05 (d, 2.0)	6.03 (д, 2.0) 6.03 (d, 2.0)	96.9	6.03 (д, 2.1) 6.03 (d, 2.1)
7			156.9	
8	5.97 (д, 2.0) 5.97 (d, 2.0)	5.92 (д, 2.0) 5.92 (d, 2.0)	94.8	5.90 (д, 2.1) 5.90 (d, 2.1)
8a			152.9	
9			131.6	
10	7.04 (д, 1.9) 7.04 (d, 1.9)	6.96 (ушс) 6.96 (brs)	115.4	7.06 (д, 1.4) 7.06 (d, 1.4)
11			145.5	
12			145.6	
13	6.78 (д, 8.1) 6.78 (d, 8.1)	6.78 (м) 6.78 (m)	115.4	6.71 (д, 8.2) 6.71 (d, 8.2)
14	6.84 (дд, 8.1, 1.9) 6.84 (dd, 8.1, 1.9)	6.78 (м) 6.78 (m)	118.2	6.66 (дд, 8.2, 1.4) 6.66 (dd, 8.2, 1.4)
3-OH	5.53 (д, 4.2) 5.53 (d, 4.2)	5.22 (д, 4.0) 5.22 (d, 4.0)		5.21 (д, 4.1) 5.21 (d, 4.1)
5-OH	9.39 (с) 9.39 (s)	8.59 (с) 8.59 (s)		8.72 (с) 8.72 (s)
7-OH	9.51 (с) 9.51 (s)	9.36 (с) 9.36 (s)		9.35 (с) 9.35 (s)
11-OH	9.08 (с) 9.08 (s)	9.04 (с) 9.04 (s)		9.02 (с) 9.02 (s)
12-OH	9.21 (с) 9.21 (s)	9.15 (с) 9.15 (s)		9.17 (с) 9.17 (s)
2′	4.70 (ушс) 4.70 (brs)	4.74 (ушс) 4.74 (brs)	79.8	4.43 (д, 8.3) 4.43 (d, 8.3)
3′	3.96 (м) 3.96 (m)	3.78 (дд, 4.0, 4.1) 3.78 (dd, 4.0, 4.1)	65.2	3.67 (м) 3.67 (m)
4′α	2.81 (дд, 17.1, 3.2) 2.81 (dd, 17.1, 3.2)	2.70 (дд, 17.3, 4.0) 2.70 (dd, 17.3, 4.0)	30.0	2.72 (дд, 16.2, 6.0) 2.72 (dd, 16.2, 6.0)
4′β	2.45 (м) 2.45 (m)	2.53 (м) 2.53 (m)		2.37 (дд, 16.2, 8.7) 2.37 (dd, 16.2, 8.7)
4′a			101.3	

Окончание табл. 1

Положение **Position**	**Соединение 1** **Compound 1** **δH (*J* в Гц)** **(δH (*J*, Hz)**	**Соединение 2** **Compound 2** **δH (*J* в Гц)** **(δH (*J*, Hz)**	**δC**	**Соединение 3** **Compound 3** **δH (*J* в Гц)** **(δH (*J*, Hz)**
5′			155.5	
6′		6.12 (с) 6.12 (s)	95.0	6.12 (с) 6.12 (s)
7′			150.6	
8′	6.09 (с) 6.09 (s)		106.0	
8′a			151.5	
9′			130.6	
10′	6.82 (д, 1.7) 6.82 (d, 1.7)	7.18 (д, 1.2) 7.18 (d, 1.2)	115.9	6.94 (м) 6.94 (m)
11′			144.9	
12′			144.9	
13′	6.69 (д, 8.1) 6.69 (d, 8.1)	6.73 (д, 8.5) 6.73 (d, 8.5)	115.4	6.76 (м) 6.76 (m)
14′	6.59 (дд, 8.1, 1.7) 6.59 (dd, 8.1, 1.7)	6.81 (дд, 8.5, 1.2) 6.81 (dd, 8.5, 1.2)	118.7	6.76 (м) 6.76 (m)
3′-OH	4.70 (д, 5.0) 4.70 (d, 5.0)	4.65 (д, 4.1) 4.65 (d, 4.1)		5.03 (д, 6.0) 5.03 (d, 6.0)
5′-OH	–	9.66 (с) 9.66 (s)		9.76 (с) 9.76 (s)
7′-OH	9.77 (с) 9.77 (s)	–		–
11′-OH	8.90 (с) 8.90 (s)	9.01 (с) 9.01 (s)		9.16 (с) 9.16 (s)
12′-OH	8.98 (с) 8.98 (s)	8.86 (с) 8.86 (s)		8.85 (с) 8.85 (s)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящего исследования были разработаны методики выделения индивидуальных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum*, с помощью которых были выделены и охарактеризованы три процианидина. Согласно данным одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии высокого разрешения, соединение **1** представляет собой димерный процианидин – эпикатехин-(2β → O → 5, 4β → 6)-эпикатехин с крайне редким типом межмономерной связи (2β → O → 5, 4β → 6). Соединения **2** и **3** представляют собой процианидин А2 – эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-эпикатехин и процианидин А1 – эпикатехин-(2β → O → 7, 4β → 8)-катехин соответственно. Соединения **1-3** выделены из растений рода *Empetrum* впервые. В дальнейшем предполагается исследование биологической активности выделенных индивидуальных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kubitzki K., ed. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer; 2004. P. 145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.
2. Huttunen S., Toivanen M., Arkko S., Ruponen M., Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against Streptococcus pneumoniae binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
3. Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. japonicum extract suppresses γ-ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(1):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
4. Nohynek L. J., Alakomi H.-L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
5. Hyun T. K., Kim H.-C., Ko Y.-J., Kim J.-S. Antioxidant, α-glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (Empetrum nigrum var. japonicum). *Saudi Journal of Biological Sciences*.2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
6. Matsuura H., Saxena G., Farmer S., Hancock R., Towers G. Antibacterial and antifungal compounds from *Empetrum nigrum*. *Planta Medica*. 1995;61(6):580. DOI: 10.1055/s-2006-959382.
7. Moerman D. E. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press: Portland; 2009. 799 p.
8. Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
9. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
10. Jarevång T., Nilsson M.-Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
11. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.
12. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., de Mejia E. G., Raskin I., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
13. Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*. 2020;38(11):2669–2679. DOI: 10.1007/s00345-019-03071-4.
14. Stamm W. E., Norrby S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infections Disease*. 2001;183(1):S1–S4. DOI: 10.1086/318850.
15. Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3(24):64–67.
16. Howell A. B. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007;51(6):732–737. DOI: 10.1002/mnfr.200700038.
17. Howell A. B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42(3):273–278. DOI: 10.1080/10408390209351915.
18. Dizaye K. Antihyperuricemic and diuretic effects of Procyanidins extracted from Crataegus monogyna. *Journal of Medical Sciences*. 2011;15(1):53–59. DOI: 10.15218/zjms.2011.0009.
19. Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S., Pruess H. G. Free radical and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148(2-3):187–197. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00210-9.
20. Shan B., Cai Y.-Z., Brooks J. D., Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnamomum burmannii): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(14):5484–5490. DOI: 10.1021/jf070424d.

21. Torras M. A. C., Faura C. A., Schönlau F., Rohdewald P. Antimicrobial activity of Pycnogenol®. *Phytotherapy Research*. 2005;19(7):647–648. DOI: 10.1002/ptr.1662.
22. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
23. Porter L. J., Ma Z., Chan B. G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1657–1663. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84228-k.
24. Lou H., Yamazaki Y., Sasaki T., Uchida M., Tanaka H., Oka S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*. 1999;51(2):297–308. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00736-5.

REFERENCES

1. Kubitzki K., ed. Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. V. 6. In: The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer; 2004. P. 145–194. DOI: 10.1007/978-3-662-07257-8.
2. Huttunen S., Toivanen M., Arkko S., Ruponen M., Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against Streptococcus pneumoniae binding to human bronchial cells. *Phytotherapy Research*. 2011;25(1):122–127. DOI: 10.1002/ptr.3240.
3. Kim K. C., Lee I. K., Kang K. A., Kim B. J., Kim D., Moon J. Y., Yoo B. S., Hyun J. W. *Empetrum nigrum* var. japonicum extract suppresses γ-ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2011;39(1):161–170. DOI: 10.1142/S0192415X11008725.
4. Nohynek L. J., Alakomi H.-L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1):18–32. DOI: 10.1207/s15327914nc5401_4.
5. Hyun T. K., Kim H.-C., Ko Y.-J., Kim J.-S. Antioxidant, α-glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (Empetrum nigrum var. japonicum). *Saudi Journal of Biological Sciences*.2016;23(2):181–188. DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.02.008.
6. Matsuura H., Saxena G., Farmer S., Hancock R., Towers G. Antibacterial and antifungal compounds from *Empetrum nigrum*. *Planta Medica*. 1995;61(6):580. DOI: 10.1055/s-2006-959382.
7. Moerman D. E. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press: Portland; 2009. 799 p.
8. Jurikova T., Mlcek J., Skrovankova S., Balla S., Sochor J., Baron M., Sumczynski D. Black crowberry (*Empetrum nigrum* L.) flavonoids and their health promoting activity. *Molecules*. 2016;21(12):1685. DOI: 10.3390/molecules21121685.
9. Ponkratova A. O., Whaley A. K., Balabas O. A., Smirnov S. N., Proksch P., Luzhanin V. G. A New Bibenzyl and 9,10-Dihydrophenanthrene Derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.). *Phytochemistry Letters*. 2021;42:15–17. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.01.001.
10. Jarevång T., Nilsson M.-Ch., Wallstedt A., Oldham G., Sterner O. A bibenzyl from *Empetrum nigrum*. *Phytochemistry*. 1998;48(5):893–896. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00955-2.
11. Wollenweber E., Dörr M., Stelzer R., Arriaga-Giner F. Lipophilic phenolics from the leaves of *Empetrum nigrum* – chemical structures and exudate localization. *Botanica Acta*. 1992;105(4):300–305. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1992.tb00302.x.
12. Kellogg J., Wang J., Flint C., Ribnicky D., Kuhn P., de Mejia E. G., Raskin I., Lila M. A. Alaskan wild berry resources and human health under the cloud of climate change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(7):3884–3900. DOI: 10.1021/jf902693r.
13. Öztürk R., Murt A. Epidemiology of urological infections: a global burden. *World Journal of Urology*. 2020;38(11):2669–2679. DOI: 10.1007/s00345-019-03071-4.
14. Stamm W. E., Norrby S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of Infections Disease*. 2001;183(1):S1–S4. DOI: 10.1086/318850.
15. Kaukhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A. The development conditions for extraction of the *Bidens tripartita* L., *Solidago canadensis* L. and *Agrimonia eupatoria* L. Herbs. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;3(24):64–67. (In Russ.)
16. Howell A. B. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2007;51(6):732–737. DOI: 10.1002/mnfr.200700038.
17. Howell A. B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2002;42(3):273–278. DOI: 10.1080/10408390209351915.
18. Dizaye K. Antihyperuricemic and diuretic effects of Procyanidins extracted from Crataegus monogyna. *Journal of Medical Sciences*. 2011;15(1):53–59. DOI: 10.15218/zjms.2011.0009.
19. Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S., Pruess H. G. Free radical and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148(2-3):187–197. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00210-9.
20. Shan B., Cai Y.-Z., Brooks J. D., Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnamomum burmannii): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(14):5484–5490. DOI: 10.1021/jf070424d.
21. Torras M. A. C., Faura C. A., Schönlau F., Rohdewald P. Antimicrobial activity of Pycnogenol®. *Phytotherapy Research*. 2005;19(7):647–648. DOI: 10.1002/ptr.1662.
22. 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.
23. Porter L. J., Ma Z., Chan B. G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*. 1991;30(5):1657–1663. DOI: 10.1016/0031-9422(91)84228-k.
24. Lou H., Yamazaki Y., Sasaki T., Uchida M., Tanaka H., Oka S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*. 1999;51(2):297–308. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00736-5.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99
УДК 615.074; 615.356

Оригинальная статья / Research article

Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D_3 (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище

И. Е. Шохин[1], Е. А. Малашенко[2], Ю. В. Медведев[1,2], М. Н. Богачук[3]*, С. А. Кулаков[3], М. А. Палеева[3]

[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
[3] ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14

***Контактное лицо:** Богачук Мария Николаевна. **E-mail:** bmariyan@mail.ru

ORCID: И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Е. А. Малашенко – http://orcid.org/0000-0002-4183-7822; Ю. В. Медведев – https://orcid.org/0000-0001-6720-4954; М. Н. Богачук – https://orcid.org/0000-0002-5820-8336; С. А. Кулаков – https://orcid.org/0000-0001-5726-1111; М. А. Палеева –https://orcid.org/0000-0003-1453-9560.

Статья поступила: 29.03.2021 **Статья принята в печать:** 24.05.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Недостаточный рацион питания и проживание в северных регионах могут способствовать развитию дефицита витамина D и, как следствие, ряда заболеваний, приводящих к снижению иммунитета. В связи с этим уже достаточно долгое время применяются витаминные лекарственные препараты, содержащие витамин D в одной из его активных форм (чаще, в виде холекальциферола, витамина D_3).

Цель. Разработать и валидировать методику определения витамина D_3 в витаминных ЛП методом ВЭЖХ с диодноматричным детектированием, с последующим определением содержания холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавок к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

Материалы и методы. Определение витамина D_3 проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 266 нм. Пробоподготовка витаминных лекарственных препаратов заключалась в экстракции метанолом (для жидких ЛФ на основе водных растворов и растворов триглицеридов) и водно-метанолным раствором (2 : 8 вода – метанол) – для твердых лекарственных форм на основе водорастворимых субстанций с витамином D_3.

Результаты и обсуждения. Была проведена валидация методики показателя «Количественное определение витамина D_3 (холекальциферола)» в витаминных препаратах методом ВЭЖХ по следующим параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность.

Заключение. Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D_3 (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 9,5–38 мкг/мл. Данная методика была использована для определения витамина D_3 в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D_3 в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

Ключевые слова: витамин D_3, холекальциферол, ВЭЖХ, лекарственные средства, БАД, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. Н. Богачук, М. А. Палеева, Ю. В. Медведев разработали и валидировали методику определения витамина D_3 и провели исследование образцов. С. А. Кулаков, И. Е. Шохин, Е. А. Малашенко проводили статистическую обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Шохин И. Е., Малашенко Е. А., Медведев Ю. В., Богачук М. Н., Кулаков С. А., Палеева М. А. Разработка, валидация и применение методики количественного определения витамина D_3 (холекальциферола) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для анализа лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):87–99. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99

HPLC-UV Method Development and Validation for Vitamin D_3 (Cholecalciferol) Quantitationin Drugs and Dietary Supplements

Igor E. Shohin[1], Evgeniya A. Malashenko[2], Yuri V. Medvedev[1,2], Maria N. Bogachuk[3]*, Stanislav A. Kulakov[3], Maria A. Paleeva[3]

[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
[3] Federal Research Center of Nutrition, Biotechnologyand Food Safety, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

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

ORCID: Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630; Evgeniya A. Malashenko – http://orcid.org/0000-0002-4183-7822; Yuri V. Medvedev – https://orcid.org/0000-0001-6720-4954; Maria N. Bogachuk – https://orcid.org/0000-0002-5820-8336; StanislavA. Kulakov – https://orcid.org/0000-0001-5726-1111; Maria A. Paleeva –https://orcid.org/0000-0003-1453-9560.

Received: 29.03.2021 **Revised:** 24.05.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. An inadequate diet and living in the northern regions can lead to a lack of vitamin D_3 and the development of diseases, including a decrease in immunity. To compensate for the lack of vitamin D, vitamin drugs are used that contain vitamin D in one of its active forms (usually in the form of cholecalciferol, vitamin D_3).

Aim. To develop and validate HPLC-UV method for the determination of vitamin D_3 in vitamin drugs and to evaluate the content of cholecalciferol in selected drugs anddietary supplements presented in the Russian Federation.

Materials and methods. Determination of vitamin D_3 was carried out by HPLC with UV detection at a wavelength 266 nm. Sample preparation of vitamin drugs was carried out by extraction with methanol (for liquid dosage forms based on aqueous or triglyceride solutions) and extraction with an aqueous-methanol solution (for solid dosage forms based on water-soluble substances with vitamin D_3) in a ratio of 2 to 8 (water-methanol).

Results and discussions. The analysis methodology for the parameter "Vitamin D_3 (cholecalciferol) content" in vitamin dosage forms by HPLC was validated according to the following validation parameters: specificity; accuracy; precision; linearity; range.

Conclusion. The analysis methodology for the parameter "Vitamin D_3 (cholecalciferol) content" in vitamin dosage forms by HPLC was developed. The method was validated according to the following validation parameters: specificity; accuracy; precision; linearity; range. The range of the method was 9,5–38 µg/ml. The method was used to determine vitamin D_3 in vitamin drugs based on water-soluble forms of vitamin D_3, in the form of aqueous solutions and form of fatty acids triglyceridessolutions.

Keywords: vitamin D_3, cholecalciferol, HPLC, drugs, dietary supplements, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria N.Bogachuk, Maria A. Paleeva, Yuri V. Medvedev developed and validated a method for the determination of vitamin D_3 and carried out a study of samples. Stanislav A. Kulakov, Igor E. Shokhin, Evgeniya A. Malashenko carried out statistical processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Shohin I. E., Malashenko E. A., Medvedev Yu. V., Bogachuk M. N., Kulakov S. A., Paleeva M. A. HPLC-UV method development and validation for vitamin D_3 (cholecalciferol)quantitationin drugs and dietary supplements. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):87–99. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-87-99

ВВЕДЕНИЕ

Витамин D на современном уровне развития биохимии уже не относят к витамину в классическом понимании этого термина. Его рассматривают как стероидный прогормон, который превращается в организме в активные метаболиты [1, 2]. Известно, что витамин D имеет два пути поступления в организм человека: с пищей (витамины D_2 и D_3) и в результате синтеза в коже под влиянием ультрафиолетового облучения (витамин D_3). Бедный рацион питания и проживание в северных регионах могут способствовать развитию у человека дефицита витамина D и, как следствие, ряда заболеваний, приводящих к снижению иммунитета. В связи с этим уже достаточно долгое время применяются витаминные лекарственные препараты, содержащие витамин D в одной из его активных форм (чаще, в виде холекальциферола, витамина D_3) (рисунок 1) [3].

Витамин D_3 входит в состав различных ЛФ ЛП и БАД к пище в виде водорастворимых субстанций (например, витамин D_3 100 SD/S, производства компании DSM Nutritional Products Ltd., Швейцария) или жирорастворимых форм, растворенных в чистых или водно-спиртовых растворах триглицеридов или растительном масле/рыбьем жире [4]. Российский рынок витаминных препаратов, содержащих в своем составе витамин D_3, в последнее время расширяется стремительно. Особенно это заметно на примере витаминных БАД к пище, в том числе с холекальциферолом в своем составе [5]. Помимо этого, производители специализированной пищевой продукции тоже стремятся идти в ногу со временем, и число продуктов, обогащенных витамином D_3, также развивается.

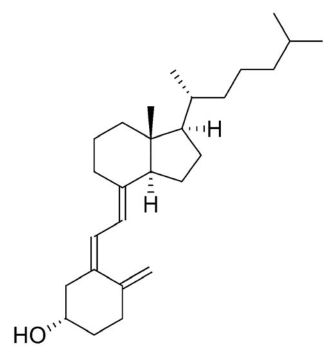


Рисунок 1. **Структурная формула витамина D_3 (холекальциферола)**

Figure 1. **Structural formula of vitamin D_3 (cholecalciferol)**

Холекальциферол достаточно нестабилен на свету и в среде, богатой кислородом. В связи с этим многостадийная подготовка проб может способствовать его разрушению и изомеризации в стерины [1, 6–8]. Классический подход для подобных объектов описан в ГОСТ 32043-2012. Подготовка проб в данном ГОСТ проводится путем омыления водно-спиртовым раствором калия гидроксида, экстракция – гексаном и последующее определение витамина D (в формах и

D_2, и D_3) – методом нормально-фазовой хроматографии [9].

Поскольку для производства витаминных ЛП, содержащих витамин D, используют водорастворимые субстанции и чистые или водно-спиртовые растворы триглицеридов, то для уменьшения потерь витамина D на этапе пробоподготовки стадию омыления опускают, переходя сразу к экстракции холекальциферола подходящим экстрагентом. Помимо этого, используют обращено-фазовую систему для хроматографирования витамина D_3 [4].

В настоящем исследовании показана разработка, валидация методики количественного определения холекальциферола в моновитаминных ЛП (таблетированных и жидких ЛФ) и применение методики для оценки содержания холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавок к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

Цель исследования. Разработать и валидировать методику определения витамина D_3 в витаминных ЛП методом ВЭЖХ с диодноматричным детектированием, а затем с её помощью оценить содержание холекальциферола в ряде лекарственных средств и биологически активных добавках к пище (БАД к пище), обращающихся на рынке РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение витамина D_3 проводили с использованием следующего оборудования:

Основное оборудование:

- высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1100 с диодноматричным детектором (з/н DE40521679/DE40915278) (США);
- весы лабораторные электронные GH-120 I кл. т. 0,1 мг, до 120 г (з/н 15101394) (A&D Company Ltd., Япония);
- дозатор пипеточный одноканальный переменного объема Eppendorf Research 500–5000 мкл (з/н 4146697) (Eppendorf, ФРГ);
- дозатор переменного объема одноканальный Eppendorf Research 100–1000 мкл, (з/н 1581088) (Eppendorf, ФРГ).

Вспомогательное оборудование:

- лабораторная система очистки воды Milli-Q (з/н F8KN02139A) (Millipore, Франция);
- ванна ультразвуковая Bandelin RK 31 (sn: 329.00072514.029) (Bandelin electronic, Германия);
- баня водяная STEGLER WB-2 с возможностью фиксации постоянной температуры;
- шейкер вибрационный типа Vortex (ELMI, Латвия);
- центрифуга типа 5424 Eppendorf (максимальное вращение до 20000 об/сек) з/н 16934300 (Eppendorf, ФРГ);
- стаканы стеклянные вместимостью 500 мл;
- колбы мерные класса «А» вместимостью 10 мл;
- ступка и пестик керамические.

Реактивы и растворы

Для проведения исследования были использованы следующие стандартные образцы и химические реактивы: стандартный образец холекальциферол (витамин D_3) (Sigma-Aldrich, США, CAS № 67-97-0, lot. LRAB2929); субстанция холекальциферола 100 SD/S (DSM Nutritional Products GmbH, Германия, серия № 11c/2397-10/0319); ацетонитрил (Panreac Quimica S.L.U, Испания, класс HPLC-gradient п. 361881.1612, годен до 06.2023 г.); кислота муравьиная 99 %, п. 270480010 (Acros Organics, Финляндия, годен до 20.04.2021 г.); метанол (ООО ТД "ХИММЕД", Россия, класс чистоты «х.ч.»), годен до 06.2021 г.; вода очищенная.

Объекты исследования

Для оценки количественного содержания холекальциферола разработанной методикой в реальных образцах были исследованы следующие лекарственные витаминные препараты: «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420); «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420). А также были исследованы витаминные БАД к пище: «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002); «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912004); «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912041); «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141); «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220).

Подготовка проб и растворов

Подвижная фаза (ПФ). В качестве ПФ использовали смесь ацетонитрила и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в процентном соотношении (70:30) в градиентном элюировании. Для приготовления 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали около 400 мл воды очищенной, 1 мл муравьиной кислоты и перемешивали. Затем доводили объем полученного раствора до метки водой очищенной и перемешивали. Хранили раствор в течение 30 суток.

Исходный и рабочий растворы стандартного образца (СО). Около 20 мг холекальциферола (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли около 40 мл метанола и перемешивали до полного растворения вещества. Затем доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и перемешивали (исходный раствор).

5,0 мл исходного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора в колбе до метки метанолом и перемешивали.

Растворы использовали в течение 10 суток после приготовления при условии хранения в морозильной камере при температуре не выше –20 °C и обертывания пробок и горлышка колбы парафином, а самой колбы – фольгой.

Экстракция. В мерную колбу вместимостью 10 мл отвешивали навеску препарата (50–500 мг). Затем прибавляли 2 мл воды очищенной, укупоривали и тщательно перемешивали на вибрационном шейкере. Колбы помещали на водяную баню на 10 минут при температуре не более чем 60 °C. После в колбу вносили 5 мл метанола, укупоривали и тщательно встряхивали получившийся раствор, при необходимости помещали на водяную баню при температуре не более чем 60 °C, затем доводили метанолом до метки и перемешивали не менее 20 раз.

Для жидких образцов, представляющих собой водные растворы и растворы триглицеридов с внесенным холекальциферолом, в мерную колбу отвешивали навеску препарата (50–500 мг). Прибавляли 5 мл метанола и тщательно перемешивали на вибрационном шейкере. Затем доводили метанолом до метки. Перемешивали не менее 20 раз.

Далее аликвоту переносили в пробирки типа Eppendorf на 2 мл и центрифугировали при 14000 об/сек. 10 минут или фильтровали через шприцевой фильтр в виалу. Полученные растворы анализировали свежеприготовленными.

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ с УФ-детектированием

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ с УФ-детектированием были подобраны в процессе эксперимента и представлены в таблице 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

При разработке методики количественного определения было отмечено, что на колонках с октадецилсиликагелевым сорбентом происходит наслоение времен удерживания природных токоферолов, используемых в качестве антиокислителей и стабилизаторов витамина D в субстанциях для производства витаминных ЛП, и определяемого витамина D_3. Тогда как колонка с полиароматическими углеводородами в качестве сорбента (ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2,1 × 150 мм, 3,5 мкм) позволяет разделить все компоненты матрицы [10].

Изократический режим элюирования на колонке с полиароматическими углеводородами не позволил получить удовлетворительные результаты по эффективности разделения компонентов матрицы [число теоретических тарелок (ЧТТ) было менее 5 тысяч], тогда как градиентный режим элюирования позволил повысить ЧТТ до 20 тысяч и более.

Подобранный режим градиентного элюирования показа в таблице 2.

Поскольку витамин D_3 имеет специфический спектр и характерный для него максимум поглощения (266 нм), а концентрация его в ЛП достаточно высока, то УФ-детектор вполне подходит для регистрации сигнала витамина D_3.

Таблица 1. **Условия хроматографического определения витамина D_3**

Table 1. **Conditions for the chromatographic determination of vitamin D_3**

Параметр Parameter	**Значение** Value
ПФ Mobile phase	Смесь ацетонитрила и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в процентном соотношении (70:30) в градиентном элюировании A mixture of acetonitrile and 0.1 % formic acid solution in percentage (70:30) in gradient elution
Скорость потока ПФ Mobile phaseflowrate	0,8 мл/мин 0,8 ml/min
Хроматографическая колонка Chromatographic column	ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2,1 × 150 мм, 3,5 мкм ZORBAX Eclipse PAH Narrow Bore 2.1 × 150 mm, 3,5 μm
Температура колонки Column temperature	40 °C
Объем инжектируемой пробы, мкл Injected sample volume, μl	2
Длина волны детектирования, нм Detection wavelength, nm	266
Время удерживания, мин t_R Retention time, min t_R	12,4
Общее время анализа, мин Total analysis time, min	15

Таблица 2. **Режим градиентного элюирования**

Table 2. **Gradient elution mode**

Время хроматографирования, мин Chromatography time, min	**ПФ А (0,1%-й раствор муравьиной кислоты), %** Mobile phase A (0.1 % formic acid solution), %	**ПФ Б (ацетонитрил), %** Mobile phase B (acetonitrile),%
0	30	70
2	30	70
10	0	100
12	0	100
14	30	70
15	30	70

Валидация методики

Валидацию методики показателя «Количественное определение витамина D_3 (холекальциферола)» в витаминных препаратах методом ВЭЖХ проводили на основе ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XIV издания, Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС от 17.07.2018 г. и РМГ 61-2010 по следующим параметрам:

- специфичность;
- правильность;
- линейность;
- диапазон применения;
- прецизионность.

Специфичность

Подтверждение специфичности проводили сравнением хроматограмм растворителя, раствора плацебо, стандартного раствора и тест-раствора, содержащего все компоненты препарата [11]. Специфичность аналитической методики доказана, если выполнятся следующие условия:

- ✓ Требования пригодности хроматографической системы должны полностью выполняться.
- ✓ Компоненты растворителя и плацебо не должны препятствовать определению количественного содержания холекальциферола в растворе (рисунки 2–4).
- ✓ Пики плацебо имеют с пиком холекальциферола разрешение более 1,5 и (или) изменяют результат определения холекальциферола менее чем на 0,5 % [12].

Согласно полученным результатам, на хроматограммах растворителя и плацебо отсутствуют пики со временем удерживания, характерным для холекальциферола.

Для раствора СО эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику холекальциферола, составила более 35 000 теоретических тарелок; фактор асимметрии пика холекальциферола – менее 1,00.

Специфичность аналитической методики доказана, так как удовлетворяются требования пригодности хроматографической системы, компоненты плацебо и растворителя не препятствуют определению количественного содержания холекальциферола в растворе.

Линейность

Раствор концентрированного стандартного образца. Около 19,0 мг (точная навеска) стандартного образца холекальциферола помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл метанола, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали (стандартный раствор).

Приготовление калибровочных стандартных растворов

Испытуемые калибровочные растворы готовили путем разбавления метанолом в мерных колбах исходного концентрированного раствора стандартного образца. Конечные концентрации растворов составили: 38 мкг/мл, 31,7 мкг/мл, 27,1 мкг/мл, 23,8 мкг/мл, 21,2 мкг/мл, 19 мкг/мл и 9,5 мкг/мл.

Аналогично готовили растворы для определения линейности с использованием стандартного образца холекальциферола (Sigma-Aldrich, США). Пример хроматограммы стандарта представлен на рисунке 5.

Критерии приемлемости:

- ✓ Наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации холекальциферола.
- ✓ Коэффициент корреляции $r_{XY} \geq 0{,}99$ [13].

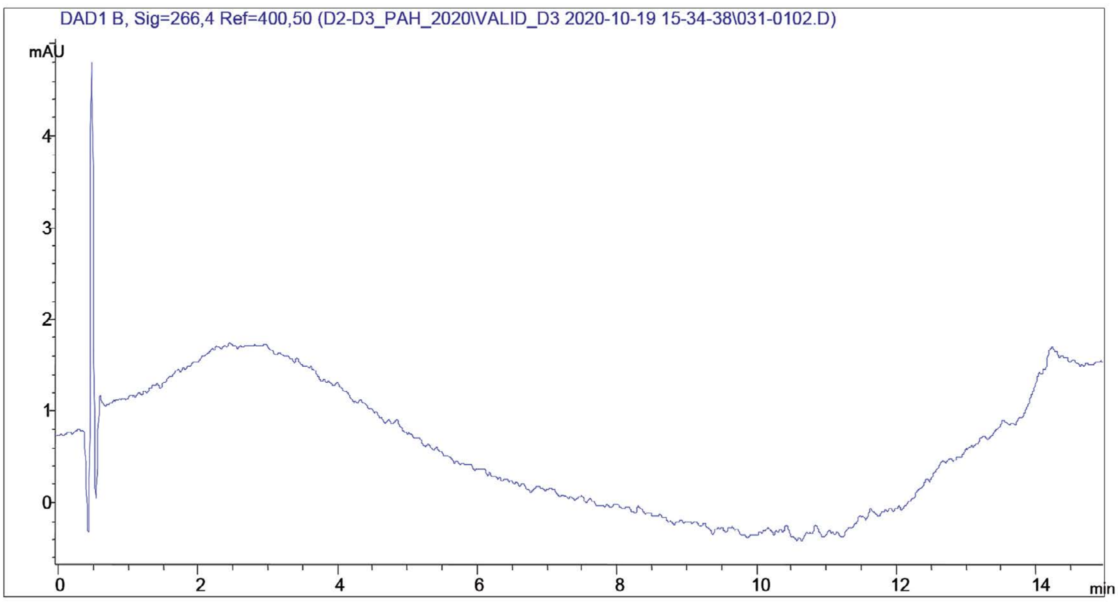


Рисунок 2. **Хроматограмма экстрагента (метанола)**

Figure 2. **Chromatogram of the extractant (methanol)**

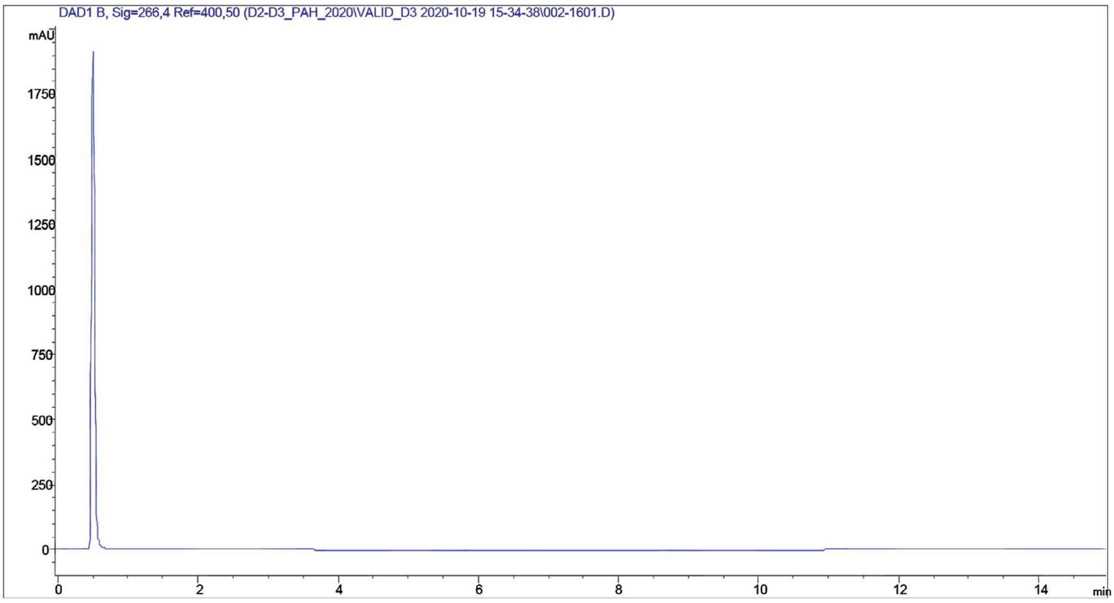


Рисунок 3. Хроматограмма сухого плацебо (таблеточная смесь «Аквадетрим», производства ООО «Акрихин»)

Figure 3. Chromatogram of dry placebo (tablet mixture Akvadetrim, produced by LLCAkrikhin)

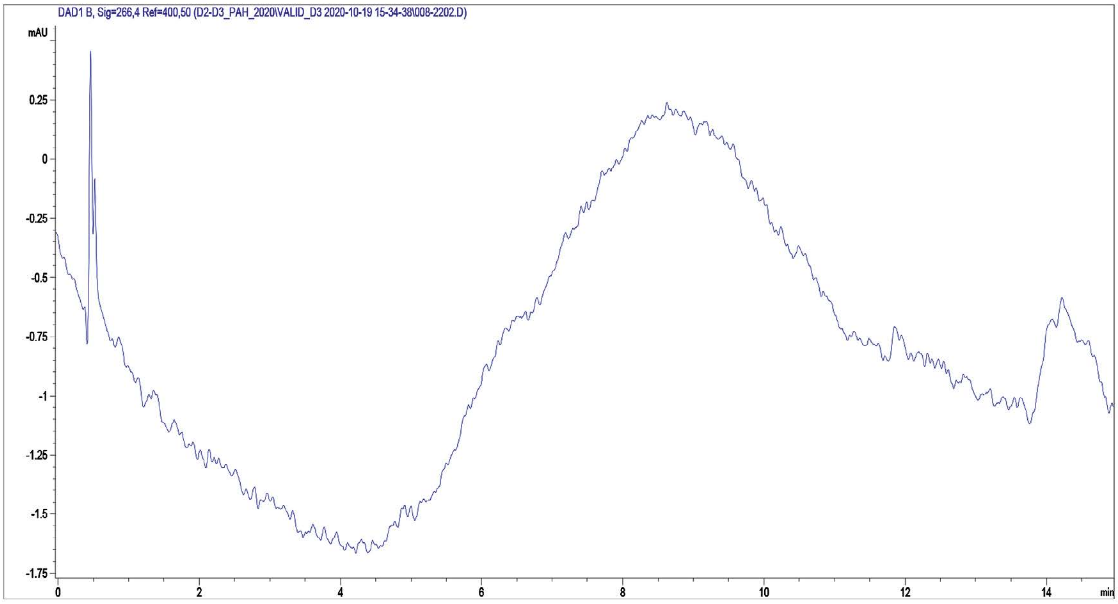


Рисунок 4. Хроматограмма жидкого плацебо (вода очищенная)

Figure 4. Chromatogram of liquid placebo (purified water)

Проводили анализ 7 образцов калибровочных растворов с концентрациями 38 мкг/мл, 31,7 мкг/мл, 27,1 мкг/мл, 23,8 мкг/мл, 21,2 мкг/мл, 19 мкг/мл и 9,5 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 4 раза. Градуировку проводили методом абсолютной калибровки. Калибровочная зависимость отношения площади пика холекальциферола от его концентрации описывалась уравнением вида $y = bx + a$. По полученным значениям были построены калибровочные графики. Калибровочные графики приведены на рисунке 6 (таблица 3).

Коэффициент корреляции для калибровочного графика $r_{xy} = 0{,}9990$, что соответствует установленной норме (не менее 0,9900).

По экспериментально измеренным значениям переменной *y* для заданных значений аргумента *x* с использованием регрессионного анализа рассчитаны коэффициенты *a* и *b*:

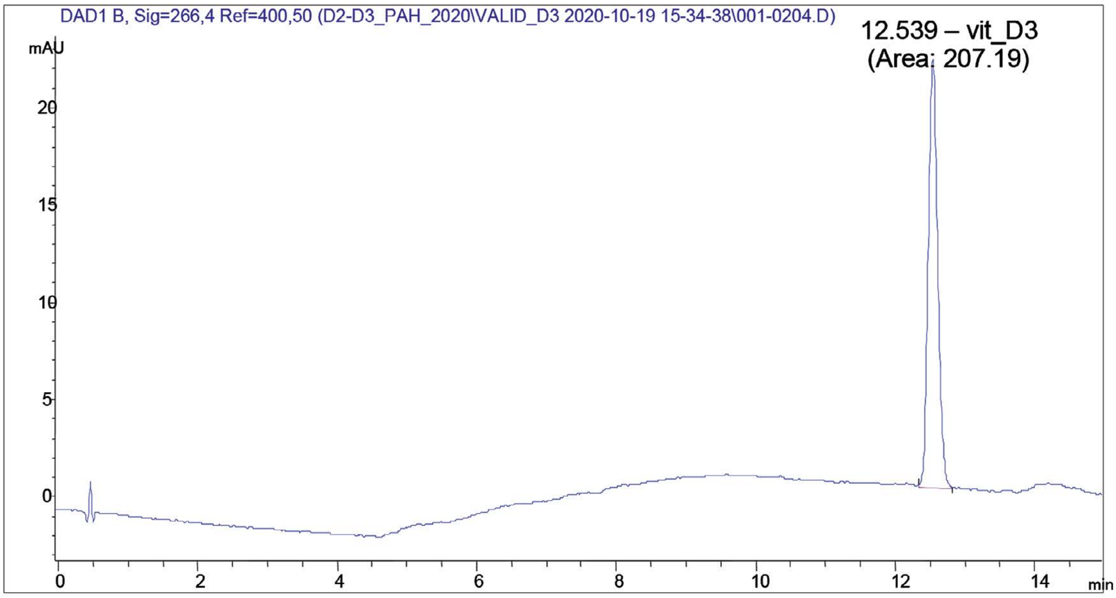


Рисунок 5. Хроматограмма стандартного образца (27,1 нг/мкл)

Figure 5. Chromatogram of a standard sample (27.1 ng/μL)

Угловой коэффициент (*b*)	7,668
Свободный член (*a*)	–3,3757

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Линейность».

Правильность

Для проверки правильности разработанной методики использовались опытные образцы, полученные путем внесения в плацебо жидкое (вода очищенная) и плацебо сухое (таблеточная смесь «Аквадетрим», производства ООО «Акрихин»), 5-и различных концентраций субстанции холекальциферола 100 SD/S.

Подготовку опытных образцов проводили согласно разделу «Подготовка проб и растворов».

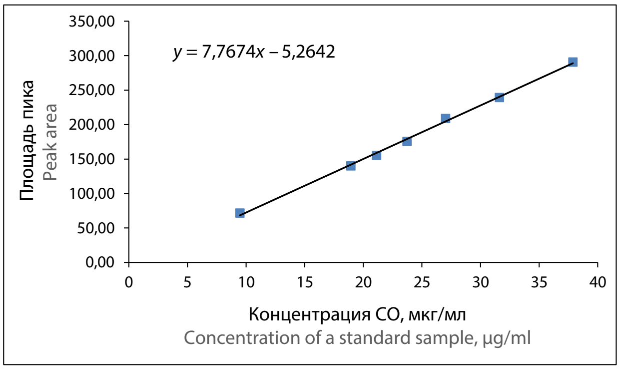


Рисунок 6. Калибровочный график стандартных растворов холекальциферола

Figure 6. Calibration curve of standard cholecalciferol solutions

Таблица 3. Сведения для оценки линейной зависимости площадей пиков от концентраций

Table 3. Information for evaluating the linear dependence of peak areas on concentrations

Содержание, нг Content, ng	**Концентрация СО, мкг/мл** Concentration of a standard sample, μg/ml	**Концентрация СО с учетом чистоты стандарта, мкг/мл** Concentration of the standard sample (corrected for the purity of the standard), μg/ml	**Площадь пика** Peak area				**Среднее значение площади пика** Average peak area
			S_1	S_2	S_3	S_4	
19	9,50	9,47	72,14	71,69	71,89	71,21	71,73
38	19,00	18,94	141,66	137,19	141,22	141,04	140,28
42,4	21,20	21,14	153,03	155,24	156,55	156,50	155,33
47,6	23,80	23,73	176,86	172,69	176,06	176,82	175,61
54,2	27,10	27,02	207,01	209,70	210,63	208,66	209,00
63,4	31,70	31,60	240,42	240,77	238,41	237,23	239,21
76	38,00	37,89	290,49	296,44	291,21	285,10	290,81

Подготовку опытных образцов проводили следующим образом: в мерные колбы вместимостью 10 мл помещали около 1,0 г плацебо (смесь всех компонентов, кроме витамина D_3, предоставленная заказчиком, и воды очищенной в качестве жидкого плацебо), добавляли разные навески субстанции холекальциферола 100 SD/S, затем добавляли 2 мл воды очищенной, укупоривали колбы, встряхивали на вибрационном шейкере и ставили на водяную баню на 10 мин при температуре не выше 60 °С. Затем прибавляли 5 мл растворителя (метанола), укупоривали и встряхивали на вибрационном шейкере, при необходимости помещали на водяную баню при температуре не выше 60 °С не более чем на 10 мин, и доводили метанолом до метки. Затем перемешивали не менее 20 раз. Полученные растворы анализировали согласно методике анализа. По полученным результатам рассчитывали концентрации холекальциферола в опытных образцах и оценивали смещение данных результатов относительно опорных значений содержания введенного стандарта при помощи таблицы Excel.

По полученным результатам рассчитывали концентрации холекальциферола в опытных образцах и оценивали смещение данных результатов относительно опорных значений содержания введенного стандарта при помощи таблицы Excel.

Анализ проводили в течение 1 рабочего дня одним аналитиком. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины восстановления и средний процент восстановления.

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Правильность»: математическое ожидание содержания добавленного в образцы стандарта холекальциферола, принятое в относительных единицах за 100 %, не выходит за пределы доверительных интервалов среднего значения восстановления (96,96; 101,56) (таблица 4).

Таблица 4. Результаты оценки правильности на плацебо сухом (пример типичной хроматограммы представлен на рисунке 7)

Table 4. The results of calculating the accuracy on placebo dry (an example of a typical chromatogram is shown in Figure 7)

Количество результатов Number of results	15
Среднее значение Z, % Mean Z, %	99,26
Дисперсия (S^2) Dispersion (S^2)	17,15
Среднее квадратичное отклонение (СКО, σ) Mean square deviation (СКО, σ)	4,14
Число степеней свободы, *f* Number of degrees of freedom, *f*	2,15
Критическое значение t-критерия Стьюдента для $P = 0,95$ The critical value of the Student's t-test for $P = 0.95$	14
Коэффициент вариации (CV, %) The coefficient of variation (CV, %)	4,17
Стандартная ошибка среднего (SEM) Standard error of the mean (SEM)	1,07
Доверительный интервал (±ΔZ), % Confidence interval (±ΔZ), %	2,30
Нижняя граница доверительного интервала, % Lower limit of the confidence interval, %	96,96
Верхняя граница доверительного интервала, % Upper limit of the confidence interval, %	101,56

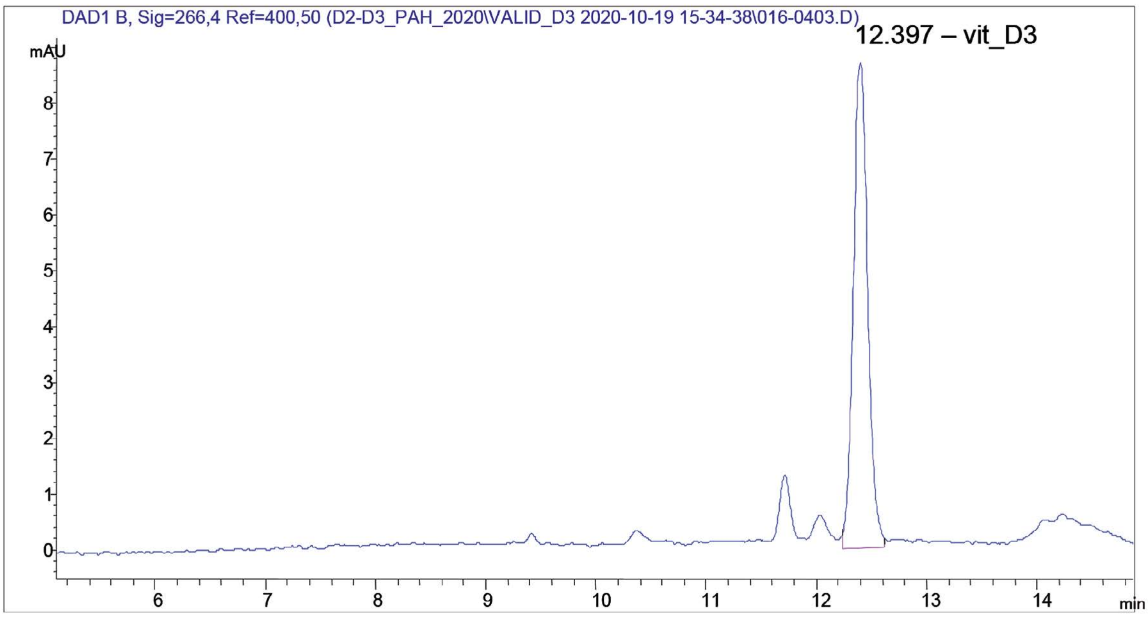


Рисунок 7. Хроматограмма сухого плацебо с добавкой субстанции холекальциферола 100 SD/S

Figure 7. Chromatogram of dry placebo with added cholecalciferol substance 100 SD/S

Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости по показателю «Правильность»: математическое ожидание содержания добавленного в образцы стандарта холекальциферола, принятое в относительных единицах за 100 %, не выходит за пределы доверительных интервалов среднего значения восстановления (99,07; 100,87) (таблица 5).

Таблица 5. Результаты оценки правильности на плацебо жидком (пример типичной хроматограммы представлен на рисунке 8)

Table 5. Results of calculating the accuracy on placebo liquid (an example of a typical chromatogram is shown in Figure 8)

Количество результатов Number of results	15
Среднее значение Z, % Mean Z, %	99,97
Дисперсия (S^2) Dispersion (S^2)	2,63
Среднее квадратичное отклонение (СКО, σ) Mean square deviation (СКО, σ)	1,62
Число степеней свободы, *f* Number of degrees of freedom, *f*	14
Критическое значение t-критерия Стьюдента для $P = 0{,}95$ The critical value of the Student's t-test for $P = 0.95$	2,15
Коэффициент вариации (CV, %) The coefficient of variation (CV, %)	1,62
Стандартная ошибка среднего (SEM) Standard error of the mean (SEM)	0,42
Доверительный интервал (±ΔZ), % Confidence interval (±ΔZ), %	0,90
Нижняя граница доверительного интервала, % Lower limit of the confidence interval, %	99,07
Верхняя граница доверительного интервала, % Upper limit of the confidence interval, %	100,87

Диапазон применения

В соответствии с полученными данными валидируемая методика обеспечивает правильность результатов и линейную зависимость аналитического сигнала от концентрации растворов, как минимум, в интервале от 0,0095 ÷ 0,038 мг/мл. Данный интервал является диапазоном применения методики по результатам валидации.

Прецизионность

Прецизионность методики оценивали согласно РМГ 61-2010 в условиях сходимости (повторяемости), т. е. при выполнении анализа одним химиком в течение короткого промежутка времени на одном и том же оборудовании, а также в условиях внутрилабораторной прецизионности при выполнении анализа образца той же серии препарата во второй день. В обоих случаях было проанализировано по шесть однородных и стабильных по составу проб препарата.

Сходимость

Определение проводили на 6 испытуемых растворах для каждого ЛП («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Аквадетрим», раствор). 6 испытуемых растворов обоих ЛП («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Аквадетрим», раствор) подготавливались по методике, описанной выше. Каждый раствор хроматографировали 3 раза, стандартный раствор холекальциферола хроматографировали 5 раз.

Анализ проводили в течение 1 рабочего дня одним аналитиком. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины среднего арифметического и дисперсии результатов (таблицы 6 и 7).

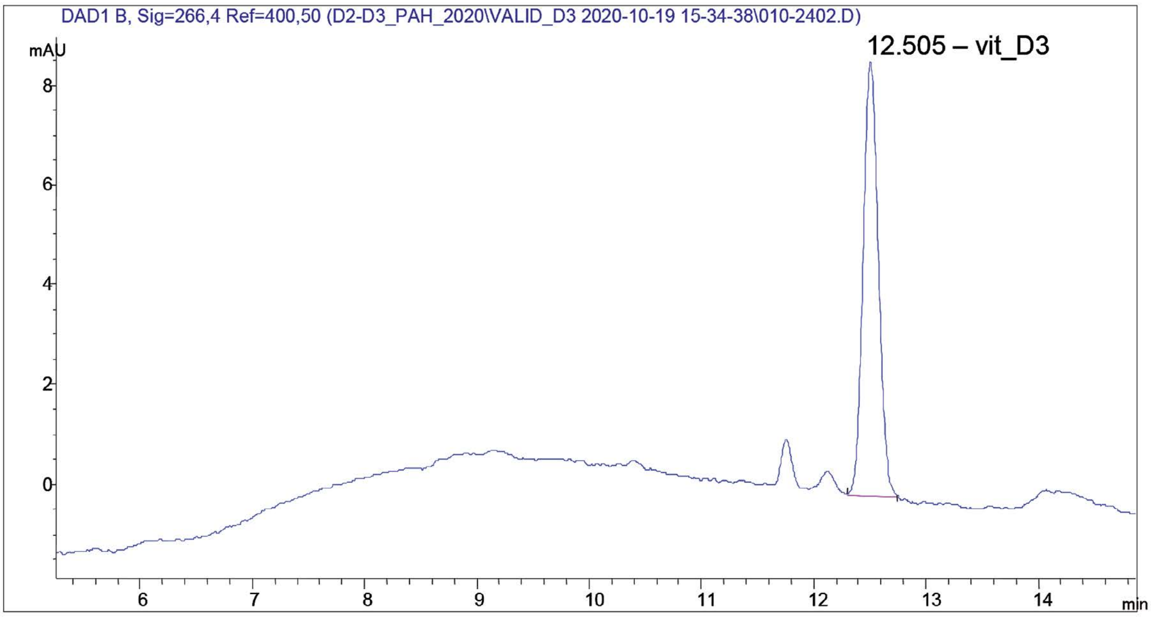


Рисунок 8. Хроматограмма жидкого плацебо с добавкой субстанции холекальциферола 100 SD/S

Figure 8. Chromatogram of liquid placebo with added cholecalciferol substance 100 SD/S

Таблица 6. **Результаты оценки сходимости для холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», таблетки растворимые**

Table 6. **The results of calculating the precision for cholecalciferol in the drug "Akvadetrim" soluble tablets**

Код образца Samplecode	Навеска, мг Weighedamount, mg	Площадь пика Peak area	Обнаружено, мкг/г Found, µg/g	Среднее по образцам $\bar{x}$, мкг/г Average content for samples $\bar{x}$, µg/g	Дисперсия результатов, S^2 Dispersion of results, S^2
АТ-1 AS-1	907,7	105,1	151,4	150,7	0,52
	907,7	104,1	150,0		
	907,7	104,6	150,7		
АТ-2 AS-2	653,4	76,74	153,6	155,2	6,37
	653,4	76,9	153,9		
	653,4	79	158,1		
АТ-3 AS-3	798	92,74	152,0	150,3	2,32
	798	91,3	149,6		
	798	91	149,1		
АТ-4 AS-4	717,2	82,67	150,8	150,1	0,75
	717,2	81,76	149,1		
	717,2	82,46	150,4		
АТ-5 AS-5	793	97,9	161,5	159,2	9,43
	793	94,4	155,7		
	793	97,25	160,4		
АТ-6 AS-6	967	100,5	135,9	134,6	1,51
	967	99,4	134,4		
	967	98,7	133,5		

В соответствии с п. 5.2.1 РМГ 61 рассчитано среднее арифметическое и дисперсии результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости. Однородность распределения дисперсий оценена с применением критерия Кохрена. Расчетное значение критерия не превысило его критической границы для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = 17$.

Однородность распределения дисперсий оценена с применением критерия Кохрена. Расчетное значение критерия не превысило его критической границы для доверительной вероятности $P = 0,95$ и числа степеней свободы $f = 17$.

Таким образом, расхождение между двумя параллельными определениями, полученными по методике, не должно превышать в 19 случаях из 20:

- 3,46 % для твердых лекарственных форм,
- 2,74 % для жидких лекарственных форм.

Внутрилабораторная прецизионность

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения холекальциферола тех же образцов, по которым проводилась оценка повторяемости («Аквадетрим», таблетки растворимые и «Аквадетрим», раствор) в другой день, по 6 навесок каждого ЛП. Содержание холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», таблетки растворимые, составила 156 мкг/1 г (12,5 мкг/табл.); в ЛП «Аквадетрим», раствор – 375 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза, стандартный раствор холекальциферола хроматографировали 5 раз.

Таблица 7. **Результаты оценки сходимости для холекальциферола в ЛП «Аквадетрим», раствор**

Table 7. **The results of calculating the precision for cholecalciferol in the drug "Akvadetrim" solution**

Код образца Samplecode	Навеска, мг Weighedamount, mg	Площадь пика Peak area	Обнаружено, мкг/г Found, µg/g	Среднее по образцам $\bar{x}$, мкг/г Average content for samples $\bar{x}$, µg/g	Дисперсия результатов, S^2 Dispersion of results, S^2
АЖ-1 AL-1	400,5	117,85	384,8	392,0	46,4
	400,5	122	398,4		
	400,5	120,3	392,8		
АЖ-2 AL-1	439,8	130,44	387,9	387,4	1,6
	439,8	130,6	388,4		
	439,8	129,8	386,0		
АЖ-3 AL-3	501,2	139,2	363,2	367,2	13,0
	501,2	141,05	368,1		
	501,2	141,9	370,3		
АЖ-4 AL-4	509,2	140,96	362,1	363,4	9,8
	509,2	142,87	367,0		
	509,2	140,6	361,1		
АЖ-5 AL-5	458,8	131,83	375,8	377,6	6,4
	458,8	132,1	376,6		
	458,8	133,48	380,5		
АЖ-6 AL-6	423,4	124	383,0	380,6	6,1
	423,4	122,4	378,1		
	423,4	123,2	380,6		

Для полученных значений концентраций были рассчитаны средние арифметические отдельных определений, полученные одним химиком в разные дни.

В соответствии с п. 5.2.2.1 РМГ 61 была проведена проверка средних значений отдельных определений на наличие выбросов по критерию Граббса. В результате из дальнейших расчетов были отброшены средние значения определения образцов АТ-2 и АТ-5 первого дня определения.

По неотброшенным результатам рассчитано выборочное СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L}(X_l - \bar{X})^2}{L-1} + \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{N}\right)\cdot \sigma_r^2} = 8,06,$$

где N – число образцов, участвовавших в оценке прецизионности.

Относительное СКО внутрилабораторной прецизионности составило:

$$\sigma_{R,\%} = 5,4\ \%.$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики в виде предела воспроизводимости R рассчитывался по формуле:

$$R = Q\,(P, n)\ \sigma_R = 22,3,$$

$$R_{\%} = 15,0\ \%.$$

В результате оценки по критерию Граббса из дальнейших расчетов было отброшено среднее значение определения образца АЖ-1 первого дня определения.

По неотброшенным результатам рассчитано выборочное СКО результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L}(X_l - \bar{X})^2}{L-1} + \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{N}\right)\cdot \sigma_r^2} = 10,9.$$

Относительное СКО внутрилабораторной прецизионности составило:

$$\sigma_{R,\%} = 2,9\ \%.$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики в виде предела воспроизводимости R рассчитывался по формуле:

$$R = Q\,(P, n)\ \sigma_R = 30,3,$$

$$R_{\%} = 8,0\ \%.$$

Таким образом, расхождение между средними результатами двух серий определений, выполненных по методике в условиях внутрилабораторной прецизионности, не должно превышать в 19 случаях из 20:

- 15,0 % для твердых лекарственных форм;
- 8,0 % для жидких лекарственных форм.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа следующих лекарственных форм (лекарственные средства и биологические активные добавки):

Лекарственные средства:

1. «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420).
2. «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420).

Биологически активные добавки:

1. «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002).
2. «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912004).
3. «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912041).
4. «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141).
5. «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220).

Исследование всех образцов было проведено в рамках одного аналитического цикла, что позволяет снизить внутрилабораторную вариабельность результатов исследования. Пригодность хроматографической системе соответствовала нормам. На хроматограммах как твердых лекарственных форм, так и жидких отсутствовали интерферирующие пики, мешающие анализу. Таким образом, результаты исследования могут быть признаны достоверными в рамках установленных валидационных характеристик.

Результаты анализа обобщены в таблице 8, нормированы по показателю содержания мкг/г для твердых лекарственных форм и мкг/мл для жидких лекарственных форм. Для жидких лекарственных форм производился с учетом поправки на плотность:

- ✓ «Аквадетрим», водный раствор – 1 г/мл.
- ✓ «Детримакс Бэби» – 0,9437 г/мл.
- ✓ «Детримакс Актив» – 0,9447 г/мл.

Погрешность метода рассчитана по формуле:

$$\Delta = 1,96 \cdot \text{СКО},$$

где СКО – среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности (СКО для жидких форм составило 2,9 %, СКО для сухих форм составило 5,8 %).

Соответственно, погрешность метода для жидких форм (водных растворов) составила ±5,68 %, для сухих лекарственных форм ±11,37 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения показателя «Содержание витамина D_3 (холекальциферола)» в витаминных лекарственных формах методом ВЭЖХ. Методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: специфичность, правильность, линейность, диапазон применения, прецизионность. Показано, что результаты валидации удовлетворительны по всем указанным критериям. Диапазон применения методики 9,5–38 мкг/мл.

Результаты валидации методики и исследования реальных образцов показали, что данная методика может быть использована для определения витамина D_3 в витаминных лекарственных препаратах на основе водорастворимых субстанций витамина D_3, в виде водных растворов и растворов триглицеридов жирных кислот.

Таблица 8. **Результаты количественного определения витамина D_3 (холекальциферола) в лекарственных формах (лекарственные средства и биологические активные добавки)**

Table 8. **Results of quantitative determination of vitamin D_3 (cholecalciferol) in dosage forms (drugs and dietary supplements)**

Наименование препарата Drugname	**Содержание D_3 в препарате (заявленное)** Vitamin D_3 content in the drug (declared)	**Содержание D_3 в 1 г (1 мл) препарата (заявленное)** Vitamin D_3 content in 1 g (1 ml) of the drug (declared)	**Содержание D_3 в 1 г препарата (фактическое)** Vitamin D_3 content in 1 g (1 ml) of the drug (found)	**Отклонение (факт/заявленное), %** Deviation (found/ declared), %
«Ультра-Д» Ultra-D	25 мкг/табл. (масса табл. 425 мг) 25 μg/tablet (tablet weight 425 mg)	58,8 мкг/г 58.8 μg/g	52,6 мкг/г 52.6 μg/g	–10,5
«Детримакс Бэби» Detrimax Baby	5 мкг/1 каплю (200 МЕ/каплю) 5 μg/1 drop (200 IU/drop)	5 мкг/1 каплю, что соответствует 150 мкг/мл 5 μg/1 drop, equivalent to 150 μg/ml	87,7 мкг/мл 87.7 μg/ml	–41,5
«Детримакс Актив» Detrimax Active	12,5 мкг/1 каплю 12.5 μg/1 drop	12,5 мкг/1 каплю, что соответствует 375 мкг/мл 12.5 μg/1 drop, equivalent to 375 μg/ml	250,3 мкг/мл 250.3 μg/ml	–33,3
«Детримакс 1000 МЕ» Detrimax 1000 IU	25 мкг/табл. 25 μg/tablet	108,7 мкг/1 г 108.7 μg/1 g	106,1 мкг/г 106.1 μg/g	–2,4
«Детримакс 2000 МЕ» Detrimax 2000 IU	50 мкг/табл. 50 μg/tablet	208,3 мкг/1 г 208.3 μg/1 g	202,4 мкг/г 202.4 μg/g	–2,8
«Аквадетрим», водный раствор "Aquadetrim" aqueous solution	15 000 МЕ/мл; 1 капля (33,3 мкл) = = 500 МЕ (12,5 мкг/33,3 мкл) 375 мкг/мл 15,000 IU / ml; 1 drop (33.3 μl) = = 500 IU (12.5 μg/33.3 μl) 375 μg/ml	375 мкг/мл 375 μg/ml	370 мкг/мл 370 μg/ml	–1,3
«Аквадетрим», таблетки водорастворимые "Akvadetrim" water-soluble tablets	500 МЕ/табл. (12,5 мкг/табл.) 500 IU/tablet (12.5 μg/tablet)	156 мкг/1 г 156 μg/1 g	155 мкг/г 155 μg/g	–0,6

По результатам количественного определения было установлено, что:

1. Для лекарственного средства «Аквадетрим», водный раствор 10 мл, производства АО «Медана Фарма» (годен до 04.2023 г., серия № 050420), фактическое содержание витамина D_3 составило 370 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –1,3 %.
2. Для лекарственного средства «Аквадетрим», таблетки водорастворимые, производства АО «Акрихин» (годен до 04.2022 г., серия № 170420), фактическое содержание витамина D_3 составило 155 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –0,6 %.
3. Для биологически активной добавки «Ультра-Д», таблетки жевательные, производства «Фармиа Ой» (годен до 05.12.2022 г., серия № 1913870002), фактическое содержание витамина D_3 составило 58,8 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –10,5 %.
4. Для биологически активной добавки «Детримакс Бэби», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912004), фактическое содержание витамина D_3 составило 93 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –41,5%.
5. Для биологически активной добавки «Детримакс Актив», 30 мл, производства «Куртис Хелс Капс Сп.з.о.о» (годен до 11.2022 г., серия № 1912041) фактическое содержание витамина D_3 составило 265 мкг/мл, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –33,3 %.
6. Для биологически активной добавки «Детримакс 1000 МЕ», таблетки, производства «Игл Нутришиналс Инк» (годен до 02.2022 г., серия № WJ141), фактическое содержание витамина D_3 составило 106,1 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,4 %.
7. Для биологически активной добавки «Детримакс 2000 МЕ», таблетки, производства «Грокам ГБЛ Сп.з.о.о» (годен до 11.02.2023 г., серия № 260220), фактическое содержание витамина D_3 составило 202,4 мкг/г, при этом отклонение фактического содержания от заявленного на этикетке составило –2,8 %.

Следует отметить, что в витаминных БАД к пище содержание витамина D_3 подвержено большему разбросу от заявленного. Жидкие БАД для пищи на основе триглицеридов жирных кислот требуют тщательного контроля используемого сырья (контроль перекисного и кислотного числа), поскольку витамин D_3 нестабилен на свету и в среде, богатой кислородом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thomson B. M., Cressey P. J. Determination of vitamin D in foods: Current knowledge and data gaps. Wellington: Ministry for Primary Industries; 2014. 39 p.
2. Mahmoodani F., Perera C. O., Fedrizzi B., Abernethy G., Chen H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*. 2017;219:373–381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.146.
3. Вильмс Е. А., Добровольская Е. В., Турчанинов Д. В., Быкова Е. А., Сохошко И. А. Обеспеченность взрослого населения Западной Сибири витамином D: данные популяционного исследования. *Вопросы питания*. 2019;88(4):75–82. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10044.
4. Winuprasith T., Khomein P., Mitbumrung W., Suphantharika M., Nitithamyong A., McClements D. J. Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2018;83:153–164. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.047.
5. Гаммель И. В., Суворова О. В., Запорожская Л. И. Анализ тенденций российского рынка биологически активных добавок к пище. *Медицинский альманах*. 2017;6(51):154–158.
6. Perales S., Alegría A., Barberá R., Farré R. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005;11(6):451–462. DOI: 10.1177/1082013205060129.
7. Agilent Technologies 5990-8627 EN LC/MS/MS Determination of vitamin D in food. Available at: www.agilent.com/chem/QQQ. Accessed: 12.05.2021.
8. Afrozul H., Jaishen R., Laila O. A.-W., Dhabi A.. Routine HPLC Analysis of vitamin D3 and D2. *Chromsystems*. Available at: www.chromosystems.de. Accessed: 12.05.2021.
9. ГОСТ 32043-2012 Премиксы. Методы определения витаминов A, D, E. Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/1200104849/titles/353F5U8. Ссылка активна на 12.05.2021.
10. Эпштейн Н. А. Проверка пригодности хроматографической системы: влияние поправочных коэффициентов и поздно выходящих пиков примесей на требование к отношению сигнал/шум. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(1):108–112. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112.
11. Суханова А. М., Перова И. Б., Эллер К. И., Родионова Г. М., Чернова С. В., Кузина В. Н. Разработка и валидация методики количественного определения сибутрамина в составе лекарственных препаратов методом КЭ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):141–145. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145.
12. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
13. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

REFERENCES

1. Thomson B. M., Cressey P. J. Determination of vitamin D in foods: Current knowledge and data gaps. Wellington: Ministry for Primary Industries; 2014. 39 p.
2. Mahmoodani F., Perera C. O., Fedrizzi B., Abernethy G., Chen H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chemistry*. 2017;219:373–381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.146.
3. Vilms E. A., Dobrovolskaya E. V., Turchaninov D. V., Bykova E. A., Sokhoshko I. A. Provision of vitamin D in the adult population of Western Siberia: a population-based study. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2019;88(4):75–82. (In Russ.) DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10044.
4. Winuprasith T., Khomein P., Mitbumrung W., Suphantharika M., Nitithamyong A., McClements D. J. Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*. 2018;83:153–164. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.047.
5. Gammel I. V., Suvorova O. V., Zaporozhskaya L. I. *Analiz tendentsiy rossiyskogo rynka biologicheski aktivnykh dobavok k pishche* [Analysis of trends in the Russian market of biologically active food additives]. *Meditsinskiy al'manakh = Medical Almanac*. 2017;6(51):154–158. (In Russ.)
6. Perales S., Alegría A., Barberá R., Farré R. Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005;11(6):451–462. DOI: 10.1177/1082013205060129.
7. Agilent Technologies 5990-8627 EN LC/MS/MS Determination of vitamin D in food. Available at: www.agilent.com/chem/QQQ. Accessed: 12.05.2021.
8. Afrozul H., Jaishen R., Laila O. A.-W., Dhabi A.. Routine HPLC Analysis of vitamin D3 and D2. *Chromsystems*. Available at: www.chromosystems.de. Accessed: 12.05.2021.
9. *GOST 32043-2012 Premiksy. Metody opredeleniya vitaminov A, D, E* [GOST 32043-2012 Premixes. Methods for the determination of vitamins A, D, E]. Available at: https://docs.cntd.ru/document/1200104849/titles/353F5U8. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
10. Epshtein N. A. Chromatographic system suitability testing: influence of correction factors and late eluting peaks of impurities on the requirement for the signal-to-noise ratio. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2019; 8(1):108–112. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-108-112.
11. Sukhanova A. M., Perova I. B., Eller K. I., Rodionova G. M., Chernova S. V., Kuzina V. N. Development and Validation of Sibutramine Determination in Drug Products by Capillary Electrophoresis. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):141–145. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-141-145.
12. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):129–136. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136.
13. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105
УДК 615.21

Оригинальная статья / Research article

Изучение острой токсичности и раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида

Ю. М. Домнина[1,2]*, В. В. Суслов[1,2], С. А. Кедик[1,2], Д. А. Ахмедова[1,2], А. П. Малкова[3]

[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
[3] АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»), 143090, Россия, Московская обл., г. Краснознаменск, ул. Строителей, д. 10, корп. 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; Д. А. Ахмедова – https://orcid.org/0000-0002-0951-939X; А. П. Малкова – https://orcid.org/0000-0002-2817-4817.

Статья поступила: 16.11.2020 **Статья принята в печать:** 13.01.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Налтрексона гидрохлорид в дозах 1,5–5 мг/сут показал свою эффективность при лечении ряда заболеваний. В связи с отсутствием на фармацевтическом рынке зарегистрированного препарата такого «низкодозированного» налтрексона нами проведена разработка состава назального спрея налтрексона гидрохлорида. Одним из этапов проводимых нами исследований является изучение безопасности разрабатываемого препарата. Первым шагом в этом направлении стало изучение его острой токсичности и местно-раздражающего действия.

Цель. Изучение острой токсичности и местно-раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся назальный спрей налтрексона гидрохлорида. Исследование острой токсичности проводили на половозрелых аутбредных мышах-самках. Изучение местно-раздражающего действия – на кроликах породы советская шиншилла (самцах).

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование острой токсичности показало, что препарат в дозе, значительно превышающей предполагаемую максимальную суточную терапевтическую дозу для человека, не оказывал значимого токсического действия на организм лабораторных животных. Наличие у исследуемого препарата местно-раздражающего действия в рамках проведенного эксперимента не установлено.

Заключение. Изучена острая токсичность назального спрея налтрексона гидрохлорида при внутрижелудочном введении мышам и местно-раздражающее действие на кроликах. На всех этапах эксперимента проводили наблюдения за общим состоянием животных. Состояние гомеостаза оценивали с помощью функциональных, гематологических и морфометрических методов. По результатам исследований установлено отсутствие местно-раздражающего действия на глазах кроликов, а также отсутствие токсического действия высоких доз препарата на животных. Полученные результаты позволяют продолжить разработку и изучение назального спрея налтрексона гидрохлорида.

Ключевые слова: налтрексона гидрохлорид, назальный спрей, острая токсичность, лабораторные животные

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Ю. М. Домниной были подготовлены экспериментальные образцы для проведения испытаний. А. П. Малковой был проведен эксперимент. Все авторы принимали участие в обработке полученных результатов.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ахмедова Д. А., Малкова А. П. Изучение острой токсичности и раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):101–105. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105

Study of Acute Toxicity and Irritant Effect of Nasal Spray Naltrexone Hydrochloride

Yuliya M. Domnina[1,2], Vasiliy V. Suslov[1,2], Stanislav A. Kedik[1,2], Diana A. Akhmedova[1,2], Anastasia P. Malkova[3]

[1] Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Russian Technological University", 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia
[2] JSC Institute of Pharmaceutical Technologies, 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia
[3] ANO "Institute for Biomedical Research and Technology" ("IMBIIT"), 10/1, Stroiteley str., Krasnoznamensk, Moscow region, 143090, 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; Diana A. Akhmedova – https://orcid.org/0000-0002-0951-939X; Anastasia P. Malkova – https://orcid.org/0000-0002-2817-4817.

Received: 16.11.2020 **Revised:** 13.01.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Acute toxicity of naltrexone hydrochloride nasal spray during intragastric administration to mice and local irritant effect on rabbits was studied. At all stages of the experiment, observations were made on the General condition of the animals. The state of homeostasis was evaluated using functional, hematological and morphometric methods. According to the results of research, there was no local irritant effect on the eyes of rabbits, as well as no toxic effect of high doses of the drug on animals. Introduction. Naltrexone hydrochloride in doses of 1.5–5 mg/day has shown its effectiveness in the treatment of a number of diseases. Due to the lack of such a "low-dose" naltrexone registered on the

pharmaceutical market, we have developed the composition of the nasal spray naltrexone hydrochloride. One of the stages of our research is to study the safety of the drug being developed. The first step in this direction was to study its acute toxicity and local irritant effect.
Aim. Study of acute toxicity and local irritant effect of naltrexone hydrochloride nasal spray.
Materials and methods. The object of the study was a nasal spray of naltrexone hydrochloride. Acute toxicity studies were performed on outbred adult mice (females). Study of local irritant effect on Soviet chinchilla rabbits (males).
Results and discussion. The study of acute toxicity showed that the drug, at a dose significantly higher than the estimated maximum daily therapeutic dose for humans, did not have a significant toxic effect on the body of laboratory animals. The presence of a local irritant effect in the studied drug was not established in the framework of the experiment.
Conclusion. As part of the experiment, the drug under study did not have a local irritant or toxic effect on the animal body. The results obtained allow us to continue the development and study of the nasal spray naltrexone hydrochloride.

Keywords: naltrexone hydrochloride, nasal spray, acute toxicity, laboratory animals

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Yuliya M. Domnina experimental samples were prepared for testing. Anastasia P. Malkova an experiment was carried out. All authors took part in the processing of the obtained results.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Akhmedova D. A., Malkova A. P. Study of acute toxicity and irritant effect of nasal spray naltrexone hydrochloride. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):101–105. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексона гидрохлорид в дозах 1,5–5 мг/сут показал свою эффективность при экспериментальном применении для терапии рассеянного склероза, болезни Крона, фибромиалгии, синдрома приобретенного иммунодефицита и ряда других заболеваний [1].

В связи с отсутствием на фармацевтическом рынке зарегистрированного препарата, обеспечивающего такие дозировки налтрексона, нами проведена разработка назального спрея налтрексона гидрохлорида [2]. Несмотря на то что острая токсичность компонентов, входящих в состав спрея, известна, ее изучение является обязательным исследованием в рамках доклинических испытаний для гибридных лекарственных препаратов при изменении лекарственной формы.

В статье изложены результаты изучения острой токсичности и местно-раздражающего действия назального спрея налтрексона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлся назальный спрей налтрексона гидрохлорида, разработанного ранее состава [2].

Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых аутбредных мышах-самках, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН, и кроликах породы советская шиншилла – из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино».

Мыши имели массу 18–22 г, кролики – 2,0–2,5 кг. Масса животных, отобранных для эксперимента, не отклонялась от средней по группе более чем на 10 %. Животных содержали в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами в барьерных и стандартных помещениях, рекомендуемых для содержания грызунов [3, 4]. Карантин животных составлял 10 суток. Во время этого периода за животными вели ежедневное наблюдение. Все животные оставались здоровыми.

Мышей содержали по 6 особей в клетках из поликарбоната, кроликов – в индивидуальных клетках из нержавеющей стали. Все клетки имели приспособления для корма и воды. Для кормления мышей использовали комбинированный корм ПК-120 для лабораторных мышей и крыс (сертификат соответствия № РОСС RU.ПТ 62.Д00511 ГОСТ Р 55453-2013 до 04.04.2021 г.), для кроликов К-122 (сертификат соответствия № РОСС RU.ПС 04.Д00222 ГОСТ Р 32897-14 до 14.05.2021 г.). Животные получали корм без ограничения, за исключением ночи перед взвешиванием и эвтаназией. Поили животных фильтруемой водопроводной водой в стандартных питьевых бутылочках со свободным доступом животных к воде.

Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей [5].

Исследование острой токсичности

Для изучения острой токсичности рандомизировано были сформированы экспериментальная и контрольная группы самок, состоящие из 6 голов. Отбор был проведен методом случайной выборки с учетом массы тела. Животные экспериментальной группы получали внутрижелудочно исследуемый препарат в максимально разрешенном объеме 1 мл [6]. Животным контрольной группы внутрижелудочно вводили воду очищенную в таком же объеме.

В течение исследования, ежедневно утром и во второй половине дня, вели наблюдение за каждым животным. В день введения препаратов наблюдение проводили каждый час.

Массу тела определяли взвешиванием до введения препаратов и на 3, 7, 15 сутки эксперимента. Животных взвешивали на весах ACOM PC-100W-5 (ACOM, Южная Корея, свидетельство о поверке № АБ 0287869 до 26.03.2021). Точность используемых весов была верифицирована до начала исследования.

Забор крови для клинического анализа производили из хвостовой вены после 18 часов голодания. Кровь отбирали в специальные пробирки «Юнивет» с антикоагулянтом ЭДТА. Анализы проводили на гематологическом анализаторе Mindray BC-2800-vet (Mindray, Китай, свидетельство о поверке № АБ 0177073 до 28.10.2020). Определяли следующие показатели:

- количество эритроцитов (RBC);
- гематокрит (HCT);
- количество тромбоцитов (PLT);
- количество гемоглобина (HGB);
- количество лейкоцитов (WBC) с дифференцированием по трем популяциям: лимфоциты (LYM), моноциты (MID), гранулоциты (GRAN).

На 15 сутки эксперимента всех животных подвергали эвтаназии методом ингаляции двуокиси углерода (CO_2) с дальнейшим макроскопическим и морфометрическим исследованием органов. После регистрации смерти мышей подвергали полной некропсии, которая включала осмотр внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей с органами и тканями.

Макроскопически исследовали лимфатические узлы, аорту, сердце, гортань, трахею, легкие, тимус, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень с желчным пузырем, поджелудочную железу, селезенку, почки, надпочечники, мочевой пузырь, яичники, матку, влагалище, подчелюстную слюнную железу с лимфатическими узлами, щитовидную железу и головной мозг.

Взвешивали сердце, легкие, тимус, печень, селезенку, почки, яичники, надпочечники и головной мозг.

Оценка местно-раздражающего действия

Оценку местно-раздражающего действия препарата проводили на глазах кролика. Использовали трех кроликов. За сутки до начала проведения эксперимента визуально проверяли оба глаза каждого кролика на предмет обнаружения отклонений от нормы. Препарат вводили в нижний отдел конъюнктивального мешка правого глаза по 0,1 мл однократно. Контролем служил левый глаз, куда вводили 0,1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Наблюдение проводили в течение 24, 48, 72 часов с момента нанесения. Осмотр проводили с использованием лупы и офтальмоскопа при фокальном освещении.

Обработка данных

Все экспериментальные данные обрабатывались методом вариационной статистики (принятый уровень значимости – $P \leq 0{,}05$). Достоверность результатов оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения острой токсичности был выбран внутрижелудочный способ введения. Исследуемый препарат вводили мышам в объеме 1 мл, что соответствует средней введенной дозе 1089 мг/кг. Так как исследуемый препарат содержит термореверсивный полимер и способен к загустеванию при температурах 35–37 °C, во избежание закупорки желудочно-кишечного тракта животных, препарат был разбавлен водой в соотношении 1:1. Введение осуществляли два раза по 1 мл разбавленного препарата с перерывом между введениями длительностью 2 часа.

Предполагаемая доза для человека 100 мкл/сут или 2,5 мг/сут по налтрексону гидрохлориду (0,036 мг/кг). Таким образом, средняя введенная доза мышам превысила предполагаемую суточную дозу для человека более чем в 30 250 раз. В связи с этим исследование острой токсичности препарата в нескольких дозах с целью установления $ЛД_{50}$ представлялось неэтичным и нецелесообразным.

Контрольным животным вводили питьевую воду в таком же объеме.

Было обнаружено, что сразу после введения препарата мыши были заторможены, наблюдался тремор, шерсть взъерошена. Однако через 24 часа состояние и поведение мышей не отличалось от состояния и поведения интактных животных. Гибели животных или отклонений в их общем состоянии или поведении в течение периода наблюдения отмечено не было. Масса тела мышей на протяжении эксперимента значимо не отличалась между группами (таблица 1).

Таблица 1. Динамика массы тела мышей-самок (грамм, M ± m)

Table 1. Dynamics of body weight in female mice (grams, M ± m)

№	Наименование группы Group name	Сутки эксперимента Day of experiment			
		Фон Background	3	8	15
1	Контроль Control	23,00 ± 0,365	22,08 ± 0,300	20,00 ± 0,316	20,83 ± 0,380
2	Эксперимент Drug	22,75 ± 0,214	21,67 ± 0,307	20,50 ± 0,183	20,58 ± 0,201

Биохимические исследования (таблица 2) свидетельствуют о том, что в исследуемых дозах налтрексона привело к достоверному сокращению числа эритроцитов в крови мышей. Однако отклонения колебались в пределах референсных значений. Остальные исследуемые показатели клинического анализа опытных групп значимо не отличались от контрольных групп.

Таблица 2. Средние показатели клинического анализа крови мышей-самок (M ± m)

Table 2. Average values of clinical blood analysis in female mice (M ± m)

Срок, сутки Term, day	Группы животных Animal groups	
	Контроль Control	Эксперимент Drug
Эритроциты (RBC), 10^{12}/л Erythrocytes (RBC), 10^{12}/l		
15	11,03 ± 0,202	10,25 ± 0,090*
Тромбоциты (PLT), 10^9/л Platelets (PLT), 10^9/l		
15	775,17 ± 50,539	767,00 ± 31,968
Гематокрит (HCT), % Hematocrit (HCT), %		
15	51,25 ± 0,958	47,55 ± 0,454
Гемоглобин (HGB), г/л Hemoglobin (HGB), g/l		
15	163,67 ± 4,271	157,17 ± 1,302
Лейкоциты (WBC), 10^9/л Leukocytes (WBC), 10^9/l		
15	8,87 ± 1,434	10,86 ± 1,444
Лимфоциты (LYM), % Lymphocytes (LYM), %		
15	62,92 ± 7,896	64,60 ± 6,033
Моноциты (MID), % Monocytes (MID), %		
15	6,37 ± 1,751	7,30 ± 1,648
Гранулоциты (GRAN), % Granulocytes (GRAN), %		
15	30,72 ± 6,170	28,10 ± 4,395

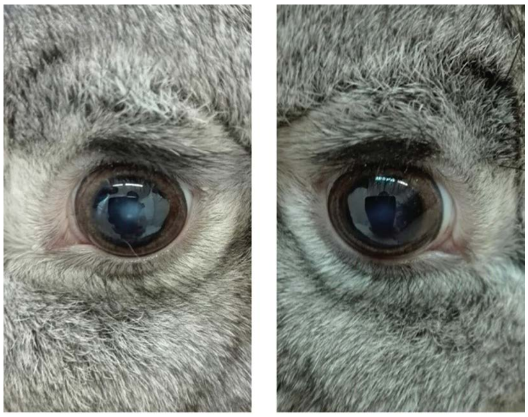
Согласно результатам морфометрического исследования, проведенного через 15 суток после введения препарата, никаких отклонений выявлено не было. Все макроскопически исследованные органы (сердце, легкие, тимус, желудок, печень, почки, надпочечники и др.) не имели различий с контрольной группой. Относительная масса внутренних органов мышей оставалась в пределах физиологической нормы (таблица 3).

Местно-раздражающее действие оценивали по состоянию роговицы (наличия/отсутствия: помутнения, поражения), радужной оболочки (наличия/отсутствия: реакции на свет, набухания, инъецирования сосудов), конъюнктивы (наличия/отсутствия: инъецирования сосудов), а также наличию отека и выделений (рисунок 1). При визуальном обследовании ни у одного животного не было выявлено патологии и установлено, что препарат – спрей назальный налтрексона гидрохлорида – не оказывает местно-раздражающего действия при инстилляциях в конъюнктивальный мешок глаз животных.

Таблица 3. Средние групповые показатели относительной массы внутренних органов мышей-самок (%)

Table 3. Average group indicators of the relative mass of internal organs of female mice (%)

Органы Organ	Группа животных Animal groups	
	Группа № 1 Контроль Group №1 Control	Группа № 2 Эксперимент Group № 2 Drug
Печень Liver	0,91 ± 0,033	0,85 ± 0,036
Почки Kidney	0,25 ± 0,006	0,25 ± 0,006
Селезенка Spleen	0,07 ± 0,002	0,07 ± 0,003
Сердце Heart	0,09 ± 0,002	0,10 ± 0,003
Тимус Thymus	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,003
Гонады Gonads	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,002
Легкие Lungs	0,17 ± 0,034	0,18 ± 0,023
Надпочечники Adrenal glands	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,001
Головной мозг Brain	0,41 ± 0,012	0,43 ± 0,005



А
A

Б
B

Рисунок 1. Глаз кролика спустя 24 часа с момента введения: А – физиологического раствора, контрольный глаз; Б – препарат, опытный глаз

Figure 1. Rabbit's eye 24 hours after administration: A – saline solution, control eye; B – drug, experienced eye

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное на аутбредных половозрелых мышах исследование показало, что в условиях внутрижелудочного введения препарат в дозе, превышающей предполагаемую максимальную суточную терапевтическую дозу для человека более чем в 30 250 раз, не оказал значимого токсического действия на организм лабораторных животных. Наличия у исследуемого препарата местно-раздражающего действия в рамках проведенного эксперимента не установлено.

Полученные результаты позволяют продолжить разработку и изучение назального спрея налтрексона гидрохлорида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
2. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора вспомогательных компонентов назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(4):73–77.
3. ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств». Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/1200126923.
4. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 года, № 51). Доступно по: http://docs.cntd.ru/document/420219460.
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986.
6. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.

REFERENCES

1. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
2. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(4):73–77. (In Russ.)
3. GOST R 56701-2015 *"Lekarstvennye sredstva dlya meditsinskogo primeneniya. Rukovodstvo po planirovaniyu doklinicheskikh issledovaniy bezopasnosti s tsel'yu posleduyushchego provedeniya klinicheskikh issledovaniy i registratsii lekarstvennykh sredstv"* [Medicinal products for medical use. Guidelines for planning preclinical safety studies for subsequent clinical trials and drug registration]. Available at: http://docs.cntd.ru/document/1200126923. (In Russ.)
4. Sanitary and epidemiological rules SP 2.2.1.3218-14 *"Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustrojstvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskih klinik (vivariev)"* [Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)] (approved Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of August 29, 2014, No. 51). Available at: http://docs.cntd.ru/document/420219460. (In Russ.)
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
6. Mironov A. N., editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovaniy lekarstvennyh sredstv* [Guide to preclinical research of medicines]. Part 1. Moscow: Grif i K; 2013. 944 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-106-111
УДК 54.062 + 615.074 + 615.033

Оригинальная статья / Research article

Сравнительное исследование фармакокинетики субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и твердых дисперсных систем на ее основе на кроликах

В. М. Косман[1]*, Д. В. Демченко[1], Е. А. Джайн (Корсакова)[2], В. Г. Макаров[3], В. Ю. Балабаньян[2]

[1] ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, Заводская улица, д. 3, корп. 245
[2] Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, 119991, Россия, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1
[3] АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г. п. Кузьмоловский, Заводская улица, д. 3, корп. 245

***Контактное лицо:** Косман Вера Михайловна. **E-mail:** kosman.vm@doclinika.ru

ORCID: В. М. Косман – https://orcid.org/0000-0001-9690-1935; Д. В. Демченко – https://orcid.org/0000-0003-3856-3936; Е.А. Джайн (Корсакова) – https://orcid.org/0000-0003-0283-8598; В. Г. Макаров – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888; В. Ю. Балабаньян – ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5744-7060.

Статья поступила: 27.01.2021 **Статья принята в печать:** 01.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Изучение фармакокинетики лекарственных веществ и оценка их фармакокинетических параметров является необходимым этапом фармацевтической разработки оригинальных лекарственных средств, позволяющим выбрать состав и лекарственную форму препарата. Это связано с получением характеристик всех процессов, которые происходят в организме животного (человека), начиная с всасывания лекарственного средства из места введения и заканчивая его выведением из организма.

Цель. Провести исследование фармакокинетики фармацевтической субстанции и преформуляций на ее основе для подтверждения фармацевтической разработки лекарственного препарата 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и обоснования оптимального состава готовой лекарственной формы (ГЛФ).

Материалы и методы. Исследование фармакокинетики проводили на половозрелых самцах кроликов при однократном пероральном введении объектов исследования в одной дозе. Концентрации 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием. Фармакокинетические параметры рассчитывали внемодельным методом статистических моментов.

Результаты и обсуждение. Разработана методика количественного определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ; методика валидирована в диапазоне концентраций 10–720 нг/мл в соответствии с современными требованиями и удовлетворяла им по всем показателям. С применением разработанной методики выполнен анализ образцов плазмы крови, полученных от лабораторных животных после однократного перорального введения субстанции и твердых дисперсных систем (ТДС) на ее основе в дозе 10 мг/кг. На основании полученных результатов по концентрациям 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови проведен расчет основных фармакокинетических параметров исследуемых объектов. Установлено, что наибольшей относительной биодоступностью из исследованных объектов обладает ТДС с Kollidon 17PF, ее относительная биодоступность по отношению к субстанции при пероральном введении составила 583 %.

Заключение. Использование метода ТДС позволило повысить биодоступность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Полученные результаты подтвердили правильность выбора ТДС для разработки состава и технологии ГЛФ.

Ключевые слова: 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, фармацевтическая субстанция, твердые дисперсные системы, пероральное введение, фармакокинетика, кролики, плазма, ВЭЖХ-УФ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. М. Косман планировала исследование, выполняла экспериментальные работы, обработку результатов, подготовку рукописи. Д. В. Демченко произвел выбор составов и получение твердых дисперсных систем, обсуждение результатов. Е. А. Джайн (Корсакова) участвовала в экспериментальной работе, обработке и обсуждении результатов, доработке текста. В. Г. Макаров произвел критический пересмотр текста публикации. В. Ю. Балабаньяну принадлежит идея исследования, обсуждение результатов, доработка текста.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ГК № 14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г., Уникальный идентификатор контракта RF----N0817X0148).

Для цитирования: Косман В. М., Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Макаров В. Г., Балабаньян В. Ю. Сравнительное исследование фармакокинетики субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и твердых дисперсных систем на ее основе на кроликах. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):106–111. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-106-111

Comparative Pharmacokinetics Study of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil Substance and its Solid Dispersion Systems on Rabbits

Vera M. Kosman[1]*, Dmitry V. Demchenko[1], Ekaterina A. Jain (Korsakova)[2], Valeriy G. Makarov[3], Vadim Yu. Balabanyan[2]

[1] St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3/245, Zavodskaya str., urban settlement Kuzmolovo, Vsevolozhski district, Leningrad region, 188663, Russia
[2] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Medicine, 27/1, Lomonosovsky av., Moscow, 119991, Russia
[3] RMC "HOME OF PHARMACY", 3/245, Zavodskaya str., urban settlement Kuzmolovo, Vsevolozhski district, Leningrad region, 188663, Russia

***Corresponding author:** Vera M. Kosman. **E-mail:** kosman.vm@doclinika.ru

ORCID: Vera M. Kosman – https://orcid.org/0000-0001-9690-1935; Dmitry V. Demchenko – https://orcid.org/0000-0003-3856-3936; Ekaterina A. Jain (Korsakova) – https://orcid.org/0000-0003-0283-8598; Valeriy G. Makarov – https://orcid.org/0000-0002-2447-7888; Vadim Yu. Balabanyan – https://orcid.org/0000-0002-5744-7060.

Received: 27.01.2021 **Revised:** 01.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. The study of pharmacokinetics of medicinal substances and evaluation of their pharmacokinetic parameters is a necessary stage of pharmaceutical development of original medicinal agents, allowing to choose the composition and dosage form of the preparation. This is due to obtaining characteristics of all processes that occur in the body of an animal (human), from the absorption of a drug from the place of administration to its excretion from the body.

Aim. To conduct a study of the pharmacokinetics of the pharmaceutical substance and the complex compounds based on it to confirm the pharmaceutical development of a drug of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil and to justify the optimal composition of the ready dosage form (GLP).

Materials and methods. The study was carried out on male rabbits with a single oral administration of investigated objects in one dose. Plasma concentrations of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. Pharmacokinetic parameters were calculated by extramodel method of statistical moments.

Results and discussion. Assay 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil quantification in rabbit blood plasma by HPLC has been developed and validated in the concentration range 10–720 ng/ml in accordance with modern requirements and satisfies them for all indicators. Assay was applicated to analysis of plasma samples obtained from laboratory animals after a single oral administration of a substance and solid dispersion systems of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil in one dose. The main pharmacokinetic parameters of the studied objects were calculated after obtained plasma concentrations of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. It was found that the solid dispersion system with Kollidon 17PF has the greatest relative bioavailability from the examined objects; its relative bioavailability to the substance by oral administration was 583 %.

Conclusion. The solid dispersion system method increased the bioavailability of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. Obtained results confirmed correctness of solid dispersion system selection drug e composition and technology development.

Keywords: 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, pharmaceutical substance, solid dispersions, oral application, pharmacokinetics, plasma, rabbits, HPLC-UV

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Vera M. Kosman investigation planning, experiments evaluation, results proceeding and systematization, preparing the manuscript. Dmitry V. Demchenko made the compositions selection and solid disperse systems preparing, discussing the results. Ekaterina A. Dzhain (Korsakova) participated in experimental work, processing and discussing the results, text finalizing. Valeriy G. Makarov made a critical revision of the publication text. Vadim Yu. Balabanyan originated the idea of the study, discussion of the results, revision of the text.

Acknowledgment. The work was done with the financial support of the state in the face of the Ministry of Education and Science of Russia (Civil Code No. 14.N08.11.0154 dated June 02, 2017, Unique contract identifier RF---N0817X0148).

For citation: Kosman V. M., Demchenko D. V., Jain (Korsakova) E. A., Makarov V. G., Balabanyan V. Yu. Comparative pharmacokinetics study of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance and its solid dispersion systems on rabbits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):106–111. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-106-111

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические пиримидиновые производные бензофенона, технология синтеза которых была разработана в Российской Федерации, перспективны для создания новых препаратов для лечения ВИЧ-1 инфекции [1, 2].

1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил предложен в качестве оригинальной фармацевтической субстанции (ФС) [3, 4], а на его основе разработан новый лекарственный препарат для лечения ВИЧ-1 инфекции в форме таблеток [5].

В основу разработки готовой лекарственной формы (ГЛФ) положена оптимизация биофармацевтических свойств 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила путем повышения его растворимости за счет создания твердых дисперсных систем (ТДС). Исследования показали, что создание ТДС с Kollidon 17PF и лактозой позволило улучшить высвобождение ФС в условиях *in vitro* [6].

Увеличение растворимости не всегда однозначно согласуется с повышением степени всасывания ФС. Для подтверждения фармацевтической разработки лекарственного препарата на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и обоснования оптимального состава ГЛФ необходимо провести исследование фармакокинетики.

Изучение фармакокинетики – кинетики всасывания, распределения и элиминации фармакологических средств в организме, является составной частью доклинических исследований, необходимых для регистрации препарата, и регламентируется требованиями нормативных документов [7].

Целью настоящего исследования являлось изучение фармакокинетики 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила при однократном пероральном введении самцам кроликов ФС и ТДС на ее основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили: ФС – 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, синтезированная в ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, серия 003, дата изготовления 15.07.2017, срок годности 3 года.

В качестве матрицы для создания ТДС использовали лактозу (Tablettose 100, Meggle, Германия) и повидон (Kollidon® 17PF, BASF, Германия). ТДС получали методом испарения растворителя (метод растворения). Композиции с лактозой и Kollidon® 17PF готовили в соотношении 1:4.

Исследование фармакокинетики (эксперименты *in vivo*) проводили на самцах кроликов, полученных от КФХ Нера (Санкт-Петербург, Россия). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам [7, 8] и нормативным документам [правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014); Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях и др.], регулирующим проведение доклинических исследований с использованием лабораторных животных, и одобрены на заседании биоэтической комиссии (№ 1.8/18).

Объекты исследования были введены однократно перорально в дозе 10 мг/кг в виде суспензии в инертном носителе (1%-м растворе крахмала). Объем для введения животному составил 1,0 мл на 1000 г массы тела, объем введения корректировали в соответствии с данными массы тела, полученными непосредственно перед началом исследования. Распределение животных по экспериментальным группам выполнено методом модифицированной блочной рандомизации [9]. Образцы крови кроликов отбирали через 0, 15, 30, 45 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 часа после введения, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы центрифугировали для получения плазмы крови (15 мин, 3000 об/мин), полученную плазму замораживали и хранили при –20 °С. Перед началом количественного определения образцы размораживали.

Для определения концентрации 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила была разработана и валидирована методика анализа действующего вещества препарата в плазме крови кроликов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Процедура подготовки проб включала депротеинизацию ацетонитрилом с последующей заменой растворителя.

Анализ выполнен на хроматографе высокого давления LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C18(2) 4,6 × 150 мм (размер частиц сорбента 5 мкм) и предколонкой (3 мм), заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США), в изократическом режиме элюирования смесью 0,03 % раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и ацетонитрила в соотношении 60:40, скорость подачи элюента 1 мл/мин, дозируемый объем проб 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспечения LabSolutions LCsolution Version 1.25 (Shimadzu, Япония).

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного обеспечения Statistica 10.0, оценку различий проводили при уровне достоверности 95 %. Параметры фармакокинетики рассчитаны внемодельным методом статистических моментов [10] с использованием приложения PKSolver для Microsoft Office Excel [11]; рассчитаны средние арифметические значения ($\bar{X}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD), стандартные ошибки среднего значения ($S\bar{x}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Производное бензофенона – 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил (рисунок 1) – предложено в качестве ФС для получения ГЛФ в виде таблеток для лечения ВИЧ-1 инфекции [5, 6]. Для стандартизации ФС и ГЛФ, содержащей 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, предложено использовать метод ВЭЖХ с УФ-детектированием [12].

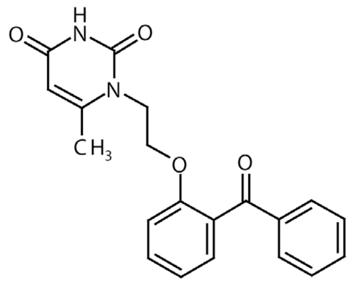


Рисунок 1. Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила

Figure 1. Structure of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil

По результатам экспериментов по разработке и валидации методик стандартизации ГЛФ были подобраны оптимальные хроматографические условия. Разработку процедуры пробоподготовки проводили на образцах плазмы крови, не содержащих добавок целевого аналита, в серии экспериментов по обработке модельных проб с добавками известных количеств 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Оптимальной была признана процедура подготовки проб, предусматривающая депротеинизацию ацетонитрилом с последующей заменой растворителя. Методика определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови валидирована надлежащим образом в соответствии с рекомендациями [13–16]. График линейной зависимости, полученный при усреднении данных для нескольких аналитических серий [каждая серия содержала калибровочные стандарты (модельные пробы с добавками аналита) восьми уровней концентраций], представлен на рисунке 2, примеры хроматограмм – на рисунке 3, основные валидационные параметры методики приведены в таблице 1.

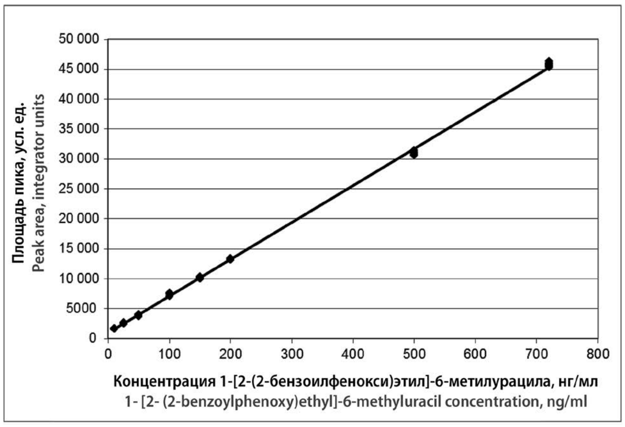


Рисунок 2. График линейной зависимости площадей хроматографических пиков 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила от его концентрации в плазме крови кроликов

Figure 2. Curve of linear regression of chromatographic peak area of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil from its concentration in rabbit plasma

Таблица 1. Валидационные параметры методики определения 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови кроликов

Table 1. Validation parameters of method for 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil quantification in rabbit plasma

Параметр Parameter	Значение Value
Калибровочный диапазон, нг/мл Calibration range, ng/ml	10–720
Уравнение регрессии* Regression equation*	$Y = 61{,}57 \cdot X + 949$
Коэффициент корреляции r Correlation coefficient r	0,9996
НПКО, нг/мл LLOQ, ng/ml	10
Точность, % Accuracy, % Внутри цикла / между циклами, % In one cycle / between cycles, % 720 нг/мл 720 ng/ml 500 нг/мл 500 ng/ml 25 нг/мл 25 ng/ml 10 нг/мл 10 ng/ml	720 нг/мл: 0,7–2,5/1,5 500 нг/мл: 1,5–3,1/2,4 25 нг/мл: 3,6–10,5/4,7 10 нг/мл: 10,3–19,8/15,6
Прецизионность, % Precision, % Внутри цикла / между циклами, % In one cycle / between cycles, % 720 нг/мл 720 ng/ml 500 нг/мл 500 ng/ml 25 нг/мл 25 ng/ml 10 нг/мл 10 ng/ml	720 нг/мл: 0,6–0,8/0,9 500 нг/мл: 0,2–0,6/0,8 25 нг/мл: 2,8–6,4/5,8 10 нг/мл: 2,3–9,7/6,1

Примечание. * Y – площадь пика 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, усл. ед.; X – концентрация 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила, нг/мл.

Note. * Y – 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil peak area, integrator units; X – 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil concentration, ng/ml.

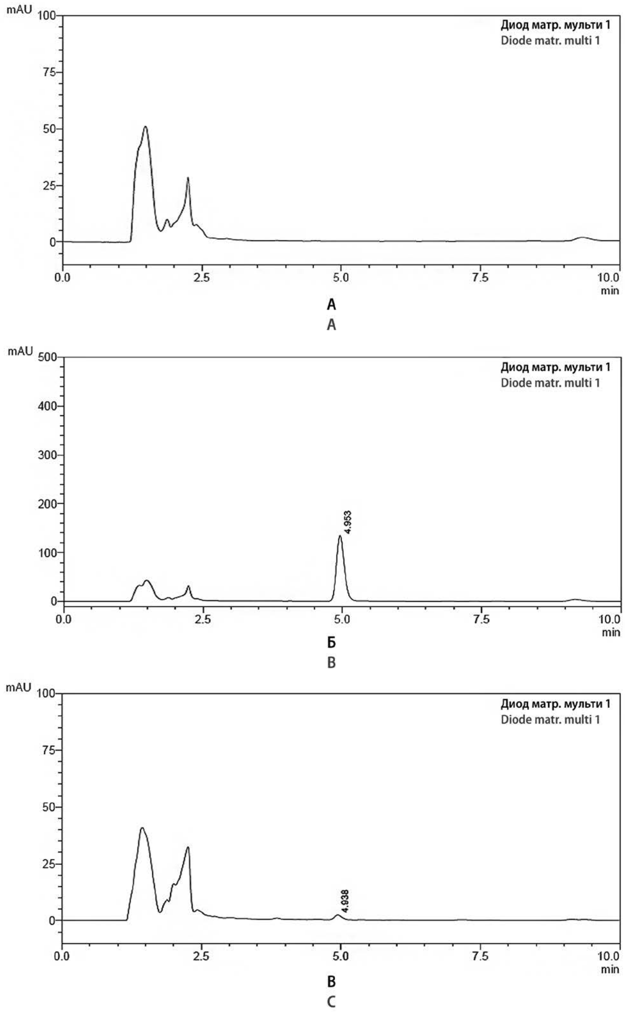


Рисунок 3. Примеры хроматограмм:

А – проба плазмы крови, не содержащая целевого аналита (бланк-проба); Б – модельная проба плазмы крови с добавкой аналита; В – экспериментальная проба после введения исследуемого препарата

Figure 3. Chromatograms examples:

A – plasma sample without analyte (blank sample); B – model plasma sample with analyte addition; C – experimental sample after drug application

Результаты свидетельствовали о специфичности, линейности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности предлагаемой методики.

Разработанная и валидированная методика была применена для анализа биопроб, полученных после перорального введения ФС и ТДС, содержащих 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в одной дозе (рисунок 4).

Кинетика 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови после введения исследуемых ФС и ТДС в дозе 10 мг/кг имела одинаковую форму кривой, характерную для лекарственных форм, применяемых перорально. Максимальную концентрацию действующего вещества в плазме крови наблюдали в интервале 4–6 часов после введения. Далее наблюдали постепенное снижение концентрации 1-[2-(2-бен-

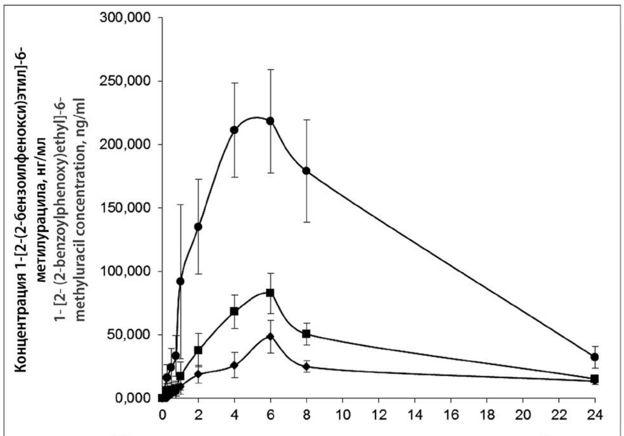


Рисунок 4. **Кривая «концентрация-время» 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в плазме крови после однократного перорального введения ФС, ТДС с Kollidon 17PF (1:4) и ТДС с лактозой (1:4) в дозе 10 мг/кг ($n = 4$, $\bar{X} \pm S\bar{x}$)**

Figure 4. **"Time-concentration" curve of 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil in plasma after single oral application of pharmaceutical substance, solid dispersion system with Kollidon 17PF (1:4) and solid dispersion system with lactose (1:4) in dose 10 mg/kg ($n = 4$, $\bar{X} \pm S\bar{x}$)**

зоилфенокси)этил]-6-метилурацила в плазме крови. Практически во всех пробах через 24 часа после введения было обнаружено содержание 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила выше, чем НПКО используемой аналитической методики. На основании полученных результатов при дальнейших исследованиях фармакокинетики можно рекомендовать пролонгировать период наблюдения до 30–48 часов.

Фармакокинетические параметры исследуемых объектов представлены в таблице 2.

Значения фармакокинетических параметров после введения ФС и ТДС имели статистически значимые отличия для показателей C_{max} и AUC_{0-24} ($p < 0,05$). Относительная биодоступность ТДС с лактозой по отношению к ФС при пероральном введении составила 184,4 %, ТДС с Kollidon 17PF составила 583,0 %. Полученные результаты свидетельствовали о более высокой (примерно в 3,2 раза) относительной биодоступности ТДС с Kollidon 17PF по сравнению с ТДС с лактозой. Для остальных фармакокинетических параметров различия статистически незначимы ($p > 0,05$).

Таким образом, наибольшей относительной биодоступностью из исследованных объектов обладал ТДС с Kollidon 17PF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволили оценить параметры фармакокинетики субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и ТДС на его основе. Использование метода ТДС с целью повышения растворимости позволило повысить биодоступность 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила. Полученные результаты подтвердили правильность выбора ТДС для разработки состава и технологии ГЛФ.

Проведенные фармакокинетические исследования позволяют рекомендовать пролонгировать период наблюдения и увеличить дозы по сравнению с исследованной (10 мг/кг) при планировании основного фармакокинетического эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., Valuev-Elliston V. T., Temburnikar K., Gurskaya G. V., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2011;19:5794–5902. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.

Таблица 2. **Фармакокинетические параметры ФС 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила и ТДС в плазме крови кроликов после однократного перорального введения в дозе 10 мг/кг**

Table 2. **Pharmacokinetic parameters of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil pharmaceutical substance and solid dispersion systems in rabbits blood plasma after single oral application in dose 10 mg/kg**

Объект исследования Study object	Параметр ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, $n = 4$) Parameter ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, $n = 4$)				
	C_{max}, нг/мл C_{max}, ng/ml	T_{max}, ч T_{max}, h	AUC_{0-24}, ч · мкг/мл AUC_{0-24}, h · ng/ml	MRT, ч MRT, h	$T_{1/2}$, ч $T_{1/2}$, h
ФС 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil pharmaceutical substance	53,2 ± 9,56	4,5 ± 1,0 (5,0)*	515,5 ± 92,1	26,4 ± 8,1	17,1 ± 6,3
ТДС с лактозой (1:4) Solid dispersion system with lactose (1:4)	83,5 ± 15,9	5,0 ± 0,5 (6,0)	950,3 ± 155,8	14,6 ± 1,9	9,0 ± 1,1
ТДС с Kollidon 17PF (1:4) Solid dispersion system with Kollidon 17PF (1:4)	241,6 ± 30,8	4,0 ± 0,8 (4,0)	3005,2 ± 616,5	10,2 ± 0,7	6,4 ± 0,6

Примечание. * – в скобках приведены значения медианы, час.

Note. * – the values of the median are given in brackets, hour.

2. Озеров А. А., Новиков М. С., Тимофеева Ю. А., Лобачев А. А., Луганченко А. И., Гейсман А. Н. Пиримидиновые ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы. *Вестник ВолгГМУ*. 2012;3:10–17.
3. Озеров А. А., Новиков М. С., Луганченко А. И., Хартман Т., Букхайт Р. У. Новые N-[2-(бензоилфенокси)этил]производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2012;4(36):15–18.
4. Петров В. И., Новиков М. С., Луганченко А. И., Озеров А. А., Рогова Н. В. Кластерный подход к созданию биотехнологических лекарственных средств. *Медицинская этика*. 2014;1:28–31.
5. Макаров В. Г., Макарова М. Н., Демченко Д. В. Способы повышения растворимости лекарственного средства на основе пиримидинового производного бензофенона. Патент РФ № 2729792. 12.08.2020.
6. Демченко Д. В., Джайн (Корсакова) Е. А., Балабаньян В. Ю., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Разработка и биофармацевтическая оценка таблеток на основе труднорастворимой субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):79–87. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
7. Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2013. С. 845–855.
8. Миронов Л. Н., ред. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2014. С. 6–44.
9. Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3rd edition). Oxford: Medical Publications; 2000. 422 p.
10. Пиотровский В. К. Метод статистических моментов и интегральные модельно независимые параметры фармакокинетики. *Фармакология и токсикология*. 1986;49(5):118–127.
11. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
12. Косман В. М., Джайн (Корсакова) Е. А., Демченко Д. В., Макаров В. Г., Балабаньян В. Ю. Стандартизация готового лекарственного средства с оригинальной субстанцией производного бензофенона для лечения ВИЧ-1 инфекции. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2021;24(1):4–10. DOI: 10.29296/25877313-2021-01-01.
13. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures. IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva. March 1994. P. 1–5.
14. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology. IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva. March 1996. P. 1–8.
15. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London: Committee for medicinal products for human use (CHMP); 2011.
16. Rockville. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine; 2018.

REFERENCES

1. Novikov M. S., Ivanova O. N., Ivanov A. V., Valuev-Elliston V. T., Temburnikar K., Gurskaya G. V., Kochetkov S. N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K. L. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011;19:5794–5902. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.025.
2. Ozerov A. A., Novikov M. S., Timofeeva Yu. A., Lobachev A. A., Luganchenko A. I., Heisman A. N. Pyrimidine non-nucleoside HIV-1 inhibitors: history of their development and perspectives. *Vestnik VolgGMU = Journal of VolgSMU*. 2012;3:10–17. (In Russ.)
3. Ozerov A. A., Novikov M. S., Luganchenko A. I., Hartman T., Buckheit R. W. Novel N-[2-(benzoylphenoxy)ethyl] nucleic bases derivatives – synthesis and anti-HIV-1 activity *in vitro*. *Volgogradskij nauchno-medicinskij zhurnal = Volgograd Journal of Medical Research*. 2012;4(36):15–18. (In Russ.)
4. Petrov V. I., Novikov M. S., Luganchenko A. I., Ozerov A. A., Rogova N. V. The cluster approach to the creation of biotech drugs. *Medicinskaya etika = Medical Ethics*. 2014;1:28–31. (In Russ.)
5. Makarov V. G., Makarova M. N., Demchenko D. V. *Methods for increasing the solubility of a drug based on a pyrimidine derivative of benzophenone* [Methods for increasing solubility of medicinal agent based on pyrimidine derivative of benzophenone]. Patent RU № 2729792. 12.08.2020. (In Russ.)
6. Demchenko D. V., Jain (Korsakova) E. A., Balabanyan V. Yu., Makarova M. N., Makarov V. G. Development and biopharmaceutical evaluation of tablets based on the poorly water-soluble substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):79–87. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-79-87.
7. Mironov A. N., editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv* [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs]. Part one. Moscow: Grif i K; 2013. P. 845–855. (In Russ.)
8. Mironov L. N., editor. *Rukovodstvo po ehkspertize lekarstvennyh sredstv* [Guidelines for the examination of medicines]. Volume 1. Moscow: Grif i K; 2014. P. 6–44. (In Russ.)
9. Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3rd edition). Oxford: Medical Publications; 2000. 422 p.
10. Piotrovskij V. K. *Metod statisticheskih momentov i integral'nye model'no nezavisimye parametry farmakokinetiki* [Method of statistical moments and integral model independent parameters of pharmacokinetics]. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1986;49(5):118–127. (In Russ.)
11. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010;99(3):306–314. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007.
12. Kosman V. M., Dzhajn (Korsakova) E. A., Demchenko D. V., Makarov V. G., Balabanyan V. Yu., Standardization of medicinal drug with original substance of benzophenone derivative for HIV-1 infection treatment. *Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2021;24(1):4–10. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2021-01-01.
13. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures. IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva. March 1994. P. 1–5.
14. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology. IFPMA. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization. Geneva. March 1996. P. 1–8.
15. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009. London: Committee for medicinal products for human use (CHMP); 2011.
16. Rockville. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine; 2018.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-112-118
УДК 615.357

Оригинальная статья / Research article

Разработка методики одновременного определения прегнанового стероида с гестагенной активностью гестобутаноила и двух его метаболитов в сыворотке крови крыс

Е. С. Степанова[1]*, Л. М. Макаренкова[1], С. В. Горяинов[1], Т. А. Федотчева[2], Н. Л. Шимановский[2]

[1] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
[2] ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова МЗ РФ), 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

***Контактное лицо:** Степанова Елена Сергеевна. **E-mail:** stepanova_25@inbox.ru

ORCID: Е. С. Степанова – https://orcid.org/0000-0003-2622-0434; Л. М. Макаренкова – https://orcid.org/0000-0002-7089-9792; С. В. Горяинов – https://orcid.org/0000-0002-7625-9110; Т. А. Федотчева – https://orcid.org/0000-0003-4998-9991; Н. Л. Шимановский – https://orcid.org/0000-0001-8887-4420.

Статья поступила: 13.01.2021 **Статья принята в печать:** 19.05.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Гестобутаноил – синтетический прегнановый стероид с гестагенной активностью имеет два метаболита (АМОЛ и мегестрола ацетат), обладающих собственной фармакологической активностью. Из этого следует необходимость детального изучения кинетики метаболитов. Рационально объединить исследование фармакокинетики гестобутаноила и его метаболитов: АМОЛа и мегестрола ацетата. Одновременное определение нескольких аналитов в сыворотке крови экспериментальных животных (крыс) возможно осуществить при помощи современных аналитических методов хромато-масс-спектрометрии.

Цель. Разработать аналитическую методику одновременного определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице (сыворотке крови крыс).

Материалы и методы. Для определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице использовали следующие методы: ГХ-МС, ВЭЖХ-ESI-МС, ВЭЖХ-ESI-МС с дериватизацией аналитов, ВЭЖХ-APCI-МС.

Результаты и обсуждение. При работе с ГХ-МС хроматографические пики гестобутаноила, АМОЛа и мегестрола ацетата сильно размывались и накладывались друг на друга, что, по-видимому, обусловлено термолабильностью веществ. От метода ГХ-МС отказались в пользу ВЭЖХ. Аналиты разделялись при помощи ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования на колонке С18. Ионизация ESI не давала типичных протонированных ионов гестобутаноила и АМОЛа, а интенсивные сигналы их катионизированных ионов и ионов-фрагментов, которые наблюдались в спектрах АМОЛа и гестобутаноила, не могли обеспечить воспроизводимость спектров, поскольку условия их образования не подходят для рутинного анализа. Дериватизация аналитов с образованием оксимов и замещенных гидразонов не давала ожидаемых продуктов реакции для работы в ВЭЖХ-ESI-МС. APCI позволила убрать интенсивные катионизированные ионы из спектров гестобутаноила и АМОЛа и увеличить надежность метода. Методика ВЭЖХ-APCI-МС воспроизвелась на модельной сыворотке крови крыс.

Заключение. Разработана ВЭЖХ-МС-методика одновременного определения гестобутаноила, мегестрола ацетата и АМОЛа. Методика апробирована на модельной сыворотке крови крыс, содержащей все три аналита.

Ключевые слова: прегнановые стероиды, гестагены, гестобутаноил, АМОЛ, мегестрол ацетат, ВЭЖХ-МС, химическая ионизация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. А. Федотчева и Н. Л. Шимановский являются авторами патента на лекарственную форму таблетки Гестобутаноил® 0,002 г. С. В. Горяинов участвовал в работе над разделами ГХ-МС-анализ и ВЭЖХ-МС с дериватизацией аналитов. Е. С. Степанова и Л. М. Макаренкова участвовали в работе над разделами, включающими ВЭЖХ-МС-анализ с дериватизацией и различными типами ионизации. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-015-00195.

Для цитирования: Степанова Е. С., Макаренкова Л. М., Горяинов С. В., Федотчева Т. А., Шимановский Н. Л. Разработка методики одновременного определения прегнанового стероида с гестагенной активностью гестобутаноила и двух его метаболитов в сыворотке крови крыс. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):112–118. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-112-118

Development of Simultaneous Determination Method of a Pregnan Steroid with Gestagenic Activity – Gestobutanoil and Two its Metabolites in Rat Serum

Elena S. Stepanova[1]*, Lyubov M. Makarenkova[1], Sergey V. Goryainov[1], Tatiana A. Fedotcheva[2], Nikolay L. Shimanovsky[2]

[1] Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
[2] Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

***Corresponding author:** Elena S. Stepanova. **E-mail:** stepanova_25@inbox.ru

ORCID: Elena S. Stepanova – https://orcid.org/0000-0003-2622-0434; Lyubov M. Makarenkova – https://orcid.org/0000-0002-7089-9792; Sergey V. Goryainov – https://orcid.org/0000-0002-7625-9110; Tatiana A. Fedotcheva – https://orcid.org/0000-0003-4998-9991; Nikolay L. Shimanovsky – https://orcid.org/0000-0001-8887-4420.

Received: 13.01.2021 **Revised:** 19.05.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Gestobutanoil is a synthetic pregnane steroid with gestagenic activity. Gestobutanoil has two pharmacologically active metabolites (AMOL and megestrol acetate). This implies the need for a detailed study of the kinetics of metabolites. It is rational to combine the study of the pharmacokinetics of gestobutanoil and its metabolites (AMOL and megestrol acetate). The simultaneous determination of several analytes in the rats' serum can be carried out using chromatography-mass-spectrometry.

Aim. Development of an analytical method for the simultaneous determination of gestobutanoil and two its metabolites in a biomatrix (rat serum).

Materials and methods. The following methods were used to determine gestobutanoyl and two its metabolites in a biological matrix: GC-MS, HPLC-ESI-MS, HPLC-ESI-MS with derivatization, HPLC-APCI-MS.

Results and discussion. When working with GC-MS, the chromatographic peaks of gestobutanoyl, AMOL, and megestrol acetate were strongly blurred and superimposed on each other, which is apparently due to the thermolability of the substances. The GC-MS method was abandoned in favor of HPLC. Analytes were separated by HPLC gradient elution on a C18 column. ESI ionization did not give typical protonated ions of gestobutanoyl and AMOL, and the intense signals of their cationized ions and fragment ions, which were observed in the spectra of AMOL and gestobutanoyl, could not ensure the reproducibility of the spectra, since the conditions of their formation are not suitable for routine analysis. Derivatization of analytes to form oximes and substituted hydrazones did not give the expected reaction products for HPLC-ESI-MS. APCI made it possible to remove intense cationized ions from the spectra of gestobutanoyl and AMOL and to increase the reliability of the method. The HPLC-APCI-MS technique was reproduced on model rat blood serum.

Conclusion. An HPLC-MS method was developed for the simultaneous determination of gestobutanoyl, megestrol acetate, and AMOL. The technique was tested on a model rat blood serum containing all three analytes.

Keywords: progestins, gestagens, gestobutanoil, AMOL, megestrol acetate, HPLC-MS, chemical ionization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Tatiana A. Fedotcheva and Nikolay L. Shimanovsky are the authors of the patent for the dosage form of the tablet Gestobutanoil® 0.002 g. Sergey V. Goryainov did the GC-MS analysis and HPLC-MS with derivatization of analytes. Elena S. Stepanova and Lyubov M. Makarenkova participated in work on sections of HPLC-MS analysis with derivatization and various types of ionization. All authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

Acknowledgment. This work was supported by the RFBR grant No. 19-015-00195.

For citation: Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Goryainov S. V., Fedotcheva T. A., Shimanovsky N. L. Development of simultaneous determination method of a pregnan steroid with gestagenic activity - gestobutanoil and two its metabolites in rat serum. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):112–118. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-112-118

ВВЕДЕНИЕ

Количественное определение эндогенных стероидных гормонов или их синтетических аналогов в рамках фармакокинетических исследований требует определенной подготовки и технической базы. В литературе для анализа стероидных гормонов в основном встречаются иммунохимические методы и методы хроматографии в сочетании с различными способами детектирования, включая масс-спектрометрию [1–4]. Стероидные гормоны являются производными циклопентанпергидрофенантрена, что придает их молекулам общие свойства липофильности и термолабильности. Впрочем, внутри группы стероидных гормонов физико-химические свойства могут различаться значительно за счет радикалов и функциональных групп, входящих в состав молекул. Данная особенность приводит к необходимости скринингового подхода к разработке методики их анализа. Фармакокинетические исследования предполагают рутинный анализ сложной биологической матрицы. Естественно, что разработка методики для подобных исследований направлена не только на соответствие валидационным требованиям и требованиям в отношении предела количественного определения, но и на достижение максимальной простоты проведения процедуры анализа.

В нашей работе аналитами были прегнановые стероиды – производные 17-гидроксипрогестерона, обладающие гестагенной активностью [5, 6]: гестобутаноил (ГБ) и два его метаболита – мепрегенола ацетат (АМОЛ) и мегестрол ацетат (МА) [7, 8]. В исследованиях биологической активности гестобутаноил проявил гестагенный, контрацептивный и цитостатический эффекты [5, 6, 9]. Метаболит МА обладает доказанной фармакологической активностью, применяется как гестагенное, противоопухолевое и антикахектическое средство при онкологических заболеваниях и истощениях организма различного генеза, например СПИД, анорексия [10]. АМОЛ обладает гестагенной и контрацептивной активностью, что подтверждено в исследованиях на животных *in vivo* [6]. Структурно аналиты похожи (таблица 1). Разница состоит в различных радикалах, содержащихся в 3-м положении стероидного ядра их молекул.

Достоверную идентификацию и количественное определение аналитов мы предполагали получить при помощи хроматографического разделения и масс-детектирования.

Целью настоящего исследования было разработать универсальную аналитическую методику одновременного определения гестобутаноила и двух его метаболитов в биологической матрице.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция 17α-ацетокси-3β-бутаноилокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (ГБ) серия 280917, чистота ≥ 99,0 % (ВЭЖХ) и субстанция 17α-ацетокси-3β-гидрокси-6-метилпрегна-4,6-диен-20-она (АМОЛ) – продукт промежуточного синтеза субстанции ГБ, чистота ≥ 99,0 % (ВЭЖХ) – предоставлены ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова, НИЛ молекулярной фармакологии, руководитель – чл.-корр. РАН, д. м. н. Н.Л. Шимановский; субстанция 17α-гидрокси-6-метил-4,6-прегнадиен-3,20-дион-17-ацетата (МА) (Sigma, США).

Реактивы: Ацетонитрил LC/MS 99,9 % (Optima LC/MS, США); вода (Optima LC/MS, США); реактив Жирара Т 98 % (Sigma-Aldrich, США); гидроксиламина гидрохлорид 99 % (Sigma-Aldrich, США).

Оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Dionex, Германия) с масс-детектором MicrOTOF-Q II (Bruker, Германия). В работе использовали два источника ионизации: ионизацию методом распыления в электрическом поле (electrospray ionization, ESI) и химическую ионизацию при атмосферном давлении (atmospheric pressure chemical ionization, APCI). Газовый хромато-масс-спектрометр модели GCMS-QP2020 (Shimadzu Corp., Япония).

Для дериватизации готовили два раствора: раствор реактива Жирара Т и раствор гидроксиламина. Реактив Жирара Т готовили путем растворения 0,5 г реактива в смеси метанол : уксусная кислота (лед.) (9 : 1). Раствор выдерживали на ультразвуковой бане до полного растворения крупинок реактива. Раствор гидроксиламина гидрохлорида готовили путем растворения 35 мг реактива в 3 мл воды, а затем к раствору добавляли 7 мл ацетонитрила.

Матричные растворы аналитов ГБ, МА и АМОЛа готовили в ацетонитриле в концентрации 0,1 мг/мл. Далее готовили два стандартных раствора – смесь аналитов в ацетонитриле. Стандартный раствор 1 с концентрацией АМОЛа 5000 нг/мл, ГБ 6000 нг/мл, МА 25 000 нг/мл; стандартный раствор 2 с концентрациями всех аналитов по 100 нг/мл. Для приготовления модельного образца к 180 мкл сыворотки добавляли 20 мкл стандартного раствора 1 или 2 и перемешивали. Пробоподготовка сыворотки заключалась в осаждении белков двукратным объемом ацетонитрила.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГХ-МС

Разделение проводили на колонке SH-Rxi-5ms 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий с постоянным потоком – 1,5 мл/мин; анализ осуществлялся в градиентном режиме. Температура колонки +40 °С (изотерма 1 мин), +300 °С (изотерма 12 мин), скорость подъема температуры 15 °С/мин. Общее время анализа – 30,0 мин. Температура испарителя +280 °С; температура ионного источника +200 °С; температура интерфейса +280 °С; режим ввода пробы – без деления потока – 1 мин; напряжение на детекторе – 0,84 кВ; ток эмиссии – 60 мкА; объем вводимой пробы – 0,1 мкл. Детектирование осуществляли в режиме полного ионного тока (SCAN) в диапазоне 40 m/z – 600 Да, со скоростью сканирования 1000 и результирующим временем 0,5 с.

На хроматограммах образцов присутствовали уширенные сигналы вместо пиков гауссовой формы, что, по-видимому, свидетельствует о термодеструкции этих соединений в инжекторе газового хроматографа.

ВЭЖХ-МС с ионизацией распылением в электрическом поле

Были подобраны условия хроматографического разделения АМОЛа, МА и ГБ. Три аналита разделялись на хроматограмме и имели разные времена удерживания при градиентном способе элюирования. Оптимизированные условия хроматографического разделения следующие: время 0,0 → 8,0 → 8,2 → 14,0 → 14,2 → 20,0 мин; вода 50 → 50 → 10 → 10 → 50 → 50 %; ацетонитрил 50 → 50 → 90 → 90 → 50 → 50 %; при скорости потока элюента 0,3 мл/мин на колонке Thermo Scientific Acclaim 300-C18, 2,1 × 150 мм, 3 мкм.

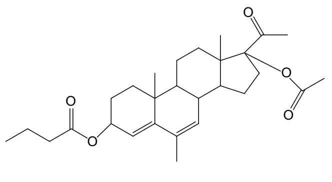
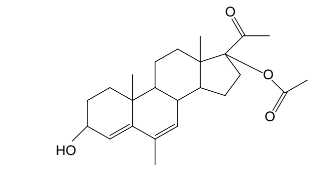
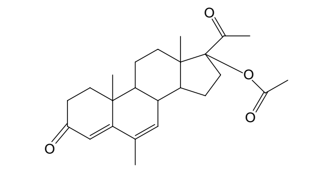
Условия детектирования: режим регистрации положительных ионов, температура источника 200 °С, напряжение на капилляре 4500 В, распыляющий (1,2 бар) и осушающий (5,0 л/мин) газ азот.

Масс-спектрометрическое детектирование аналитов выявило особенности их ионизации при распылении в электрическом поле (таблица 1). ГБ не образовывал ионов типа $[M + H]^+$, характерных для ионизации при распылении в электрическом поле (ESI). В спектре ГБ (рисунок 1) обнаруживались продукты фрагментации молекулы и катионизированные ионы типа $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$. Для количественного определения необходимо использовать наиболее интенсивный ион, воспроизводимо и надежно отображающий содержание аналита в пробе. Работа с катионизированными ионами редко может соответствовать этому требованию, поскольку использовать стандартизованную по содержанию катионов подвижную фазу в рутинном анализе без ущерба для оборудования затруднительно. Добавки солей в подвижную фазу могут привести к загрязнению камер детектора. Из-за нестабильности образования катионизированных ионов может страдать воспроизводимость спектра в целом.

АМОЛ, как и ГБ, подвергался фрагментации в источнике ионизации с образованием целого спектра ионов, в том числе катионизированных, и интенсивного фрагмента m/z 309,2. Такой же фрагмент имелся в спектре ГБ. В спектрах МА, единственного из трех аналитов, регистрировался характерный для ESI интенсивный основной ион типа $[M + H]^+$ m/z 385,2.

Таблица 1. **Аналиты и их ионы в различных типах детекторов**

Table 1. **Analytes and their ions in different types of detectors**

Название Name	**Гестобутаноил (ГБ)** Gestobutanoil (GB)	**Меперегенола ацетат (АМОЛ)** Meperegenol acetate (AMOL)	**Мегестрола ацетат (МА)** Megestrol acetate (MA)
Структурная формула Structural formula			
Брутто формула Gross formula	$C_{28}H_{40}O_5$	$C_{24}H_{34}O_4$	$C_{24}H_{32}O_4$
Молекулярная масса Molecular mass	456,3	386,3	384,2
Ионы при ионизации в ESI Ions upon ionization in ESI	$[M + Na]^+$ m/z 479,3 $[M + K]^+$ 495,2 Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	$[M + Na]^+$ m/z 409,3 $[M + K]^+$ 425,2 Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	$[M + H]^+$ 385,2 Ион-фрагмент 325,2 Ion fragment 325.2
Ионы при ионизации в APCI Ions upon ionization in APCI	Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	Ион-фрагмент 309,2 Ion fragment 309.2	$[M + H]^+$ 385,2 Ион-фрагмент 325,2 Ion fragment 325.2

Детектирование ГБ при помощи ВЭЖХ-ESI-МС показало: в спектрах ГБ и АМОЛ нет типичных для ESI ионов типа $[M + H]^+$, что затруднило выбор целевого иона. Кроме того, данные молекулы легко фрагментировались в источнике ионизации, хотя распыление в электрическом поле относится к мягким способам ионизации и редко приводит к появлению спектра фрагментации. Основным недостатком данного метода было затруднение с выбором целевого иона, интенсивность которого надежно выражала бы количественное содержание аналита в пробе.

ВЭЖХ-МС с дериватизацией аналитов

Дериватизация аналитов возможна по их метилкетоновым группам, содержащимся у всех аналитов в 17-м положении стероидного ядра молекулы, путем проведения реакции образования оксимов и гидразонов. Также МА имеет карбонильную группу в 3-м положении, которая может участвовать в данном типе реакций. В качестве дериватизирующих веществ использовали два реактива: гидроксиламина гидрохлорид и реактив Жирара Т. Дериватизацию проводили

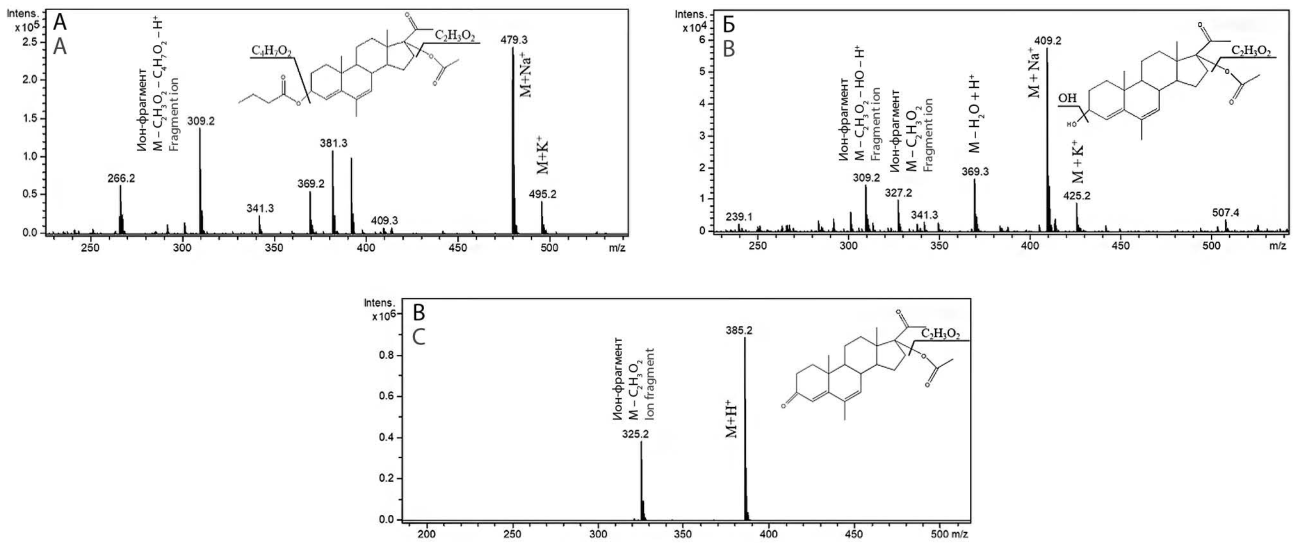


Рисунок 1. **Масс-спектры аналитов при ионизации в ESI:**
А – ГБ; Б – АМОЛ; В – МА

Figure 1. **The ESI Mass spectra of analytes:**
A – GB; B – AMOL; C – MA

путем смешения раствора аналита и раствора гидроксиламина гидрохлорида или раствора реактива Жирара Т в соотношении 1:1. Дериватизацию проводили при нагревании до 60 °С в течение 30 мин.

Было установлено, что методика, используемая для ВЭЖХ-разделения аналитов, не подходит для разделения их дериватизированных молекул, поскольку в данных условиях они практически не удерживались на колонке. Для разделения дериватизированных аналитов использовали следующий градиентный режим: время 0,0 → 8,0 → 8,2 → 14,0 → 14,2 → 20,0 мин; вода 80 → 80 → 10 → 10 → 80 → 80 %; ацетонитрил 20 → 20 → 90 → 90 → 20 → 20 %; при скорости потока элюента 0,3 мл/мин на колонке Thermo Scientific Acclaim 300-C18, 2,1 × 150 мм, 3 мкм. Ионизация аналитов проводилась при помощи ESI. На основании расчетов после дериватизации с гидроксиламином мы могли бы ожидать появление в спектрах следующих ионов: МА с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 400,2; АМОЛ с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 402,2; ГБ с гидроксиламином $[M + H]^+$ m/z 472,2. Но это предположение было верным лишь для МА. АМОЛ и ГБ не имели собственных специфичных ионов (рисунок 2). При этом в спектрах АМОЛа и ГБ после дериватизации обнаруживались некоторые количества ионов m/z 400,2. Также была проведена дериватизация с реактивом Жирара Т. Ожидаемые ионы дериватов: МА m/z 498,2; АМОЛ m/z 501,2; ГБ m/z 572,2. В эксперименте с реактивом Жирара Т подтвердились результаты эксперимента с гидроксиламином. Только на хроматограмме дериватизированного МА была обнаружена ожидаемая масса 498,2 (рисунок 2). Аналиты ГБ и АМОЛ также имели на хроматограммах пики с массой 498,2.

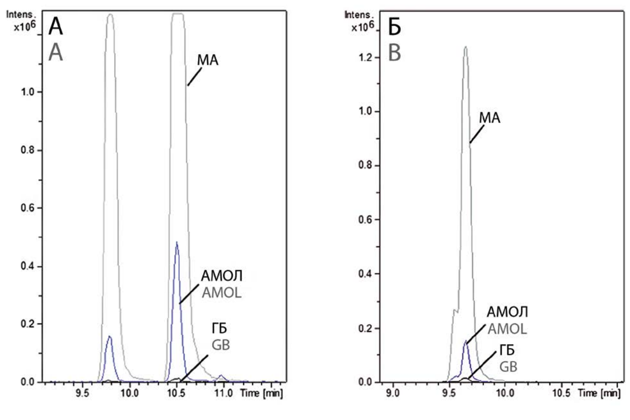


Рисунок 2. Наложенные хроматограммы продуктов дериватизации с А – гидроксиламином: по выделенным ионам m/z 400,2; Б – с реактивом Жирара Т по выделенным ионам m/z 498,3. На хроматограммах отмечены пики дериватов, полученные в индивидуальных растворах веществ МА, АМОЛ и ГБ

Figure 2. Overlaid chromatograms of derivatization products with A – hydroxylamine: for ions m/z 400.2; B – with Girard's reagent T for ions m/z 498.3. The chromatograms show the derivatization products peaks in individual solutions of the substances MA, AMOL and GB

Наличие одинаковых ионов в спектрах продуктов дериватизации ГБ, АМОЛа и МА указывает на невозможность дериватизации молекул по метилкетоновым группам в 17-м положении циклопентанпергидрофенантрена. Взаимодействие дериватизирующих агентов с МА, АМОЛом и ГБ, по-видимому, происходило через заместители у третьего атома углерода циклопентанпергидрофенантрена. У ГБ гидроксильная группа в 3-м положении защищена сложноэфирной связью, гидролиз которой в данных условиях был минимален, поскольку хроматограммы ГБ по выделенным ионам m/z 400,2 и 498,3 (рисунок 2) имеют небольшую интенсивность по сравнению с АМОЛом. Проведенный эксперимент показал, что дериватизация гидроксиламином и реактивом Жирара Т в данных условиях не подходит для одновременного определения ГБ, АМОЛа и МА в одной пробе.

ВЭЖХ-МС с химическим способом ионизации

Условия детектирования: режим регистрации положительных ионов, температура источника 210 °С, температура испарителя 400 °С, напряжение на капилляре 4000 В, коронный разряд 4000 нА, распыляющий (2,5 бар) и осушающий (4,5 л/мин) газ азот. Хроматографический режим такой же, как для ВЭЖХ-ESI-МС.

Спектры веществ в APCI, так же как и ESI-спектры, могут содержать протонированные ионы аналитов, но катионизированные ионы там практически не образуются. Данная особенность была подтверждена экспериментально. ГБ, АМОЛ и МА при ионизации в APCI имели практически те же спектры, что и в ESI, но ионы типа $[M + Na]^+$ и $[M + K]^+$ отсутствовали (таблица 1). Спектры аналитов при ионизации в APCI представлены на рисунке 3.

В качестве целевых ионов для АМОЛа и ГБ выбрали ионы-фрагменты с m/z 309,2, МА регистрировали в виде протонированной молекулы $[M + H^+]$ m/z 385,2.

Метод APCI-МС не требовал специальных условий для ионизации веществ и позволил избавиться от катионизироанных ионов в спектрах ГБ и АМОЛа. При этом для работы с APCI подошла та же методика ВЭЖХ-разделения с теми же элюентами. Хроматограмма стандартного раствора 1 со смесью аналитов, разбавленного в 30 раз ацетнирилом, представлена на рисунке 4. Три аналита имели разные времена удерживания: t_R АМОЛа составило 8,2 мин; МА – 10,2 мин; ГБ – 16,2 мин.

Анализ сыворотки крови крыс

Апробация разработанной методики ВЭЖХ-APCI-МС была проведена на биоматрице – сыворотке крови интактных крыс. Были исследованы такие валидационные параметры, как специфичность и нижний предел количественного определения (НПКО). Были

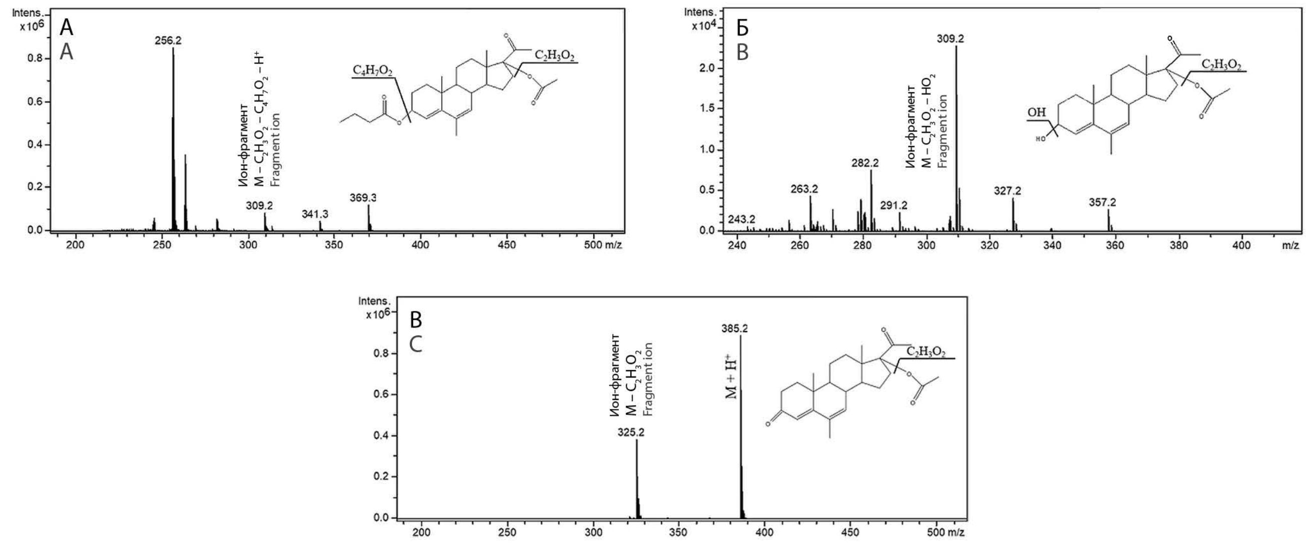


Рисунок 3. Масс-спектры аналитов при ионизации в APCI:
А – ГБ; Б – АМОЛ; В – МА

Figure 3. Mass spectra of analytes during ionization in APCI:
A – GB; B – AMOL; C – MA

проанализированы три пробы: интактная сыворотка и сыворотка крови с добавками стандартных растворов 1 и 2. Хроматограммы представлены на рисунке 4.

Сыворотка крови с добавкой стандартного раствора 1 показала воспроизведение времен удерживания аналитов по сравнению с хроматограммой стандартного раствора (рисунок 4, А, Б). В интактной сыворотке крови крыс не обнаружили эндогенных веществ, мешающих определению аналитов (рисунок 4, В). Сыворотка с добавкой стандартного раствора 2 (рисунок 4, Г) показала наличие трех пиков аналитов. Отношение S/N для НПКО должно составлять не менее 5/1. На рисунке 4, Г для ГБ, АМОЛа и МА отношения S/N составили более 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аналиты ГБ, АМОЛ и МА показали свою термолабильность в анализе при помощи газовой хроматографии. Газовая хроматография приводила к невозможности разделения и детектирования аналитов. При помощи ВЭЖХ аналиты легко разделялись в градиентном режиме элюирования на колонке с привитой фазой С18. Были рассмотрены различные варианты масс-детектирования аналитов после хроматографического разделения. Ионизация при распылении в электрическом поле (ESI) показала наличие интенсивных сигналов катионизированных ионов в спектрах ГБ и АМОЛа и отсутствие типичных для ESI протонированных ионов, что затруднило выбор целевого иона. Была изучена возможность дериватизации молекул аналитов с целью повышения их способности к ионизации. Предложенная реакция образования оксимов и гидразонов с гидроксиламином и реактивом Жирара Т не дала ожидаемых продуктов реакции АМОЛа и ГБ. Наиболее стабильным и удобным способом детектирования был определен способ химической ионизации, при котором у ГБ и АМОЛа в спектрах отсутствовали катионизированные ионы.

Апробация методики ВЭЖХ-APCI-МС на сыворотке крови крыс показала, что разработанная методика пригодна для одновременного определения трех аналитов ГБ, АМОЛа и МА в данной биоматрице.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fülöp I., Vari C.-E., Miklos A., Imre S. LC-MS/MS ESI methods for the determination of oestrogens and androgens in biological matrix – a minireview. *Farmacia*. 2017;65(4):485–493.
2. Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D., Wang X. Quantitative-Profiling Method of Serum Steroid Hormones by Hydroxylamine-Derivatization HPLC–MS. *Natural Products and Bioprospecting*. 2019;9:201–208.
3. Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(3–5):481–490. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.
4. Taylor A. E., Keevil B., Huhtaniemi I. T. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1–12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338.
5. Sheina N. I., Parshin V. A., Kolesnikova V. V., Myalina L. I., Sazonova L. P., Fedotcheva T. A., Shimanovskii N. L. Generative function of female rats upon intragastric administration of tablets of the new steroid drug gestobutanoil. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54:439–443. DOI: 10.1007/s11094-020-02219-6.
6. Zeinalov O. A., Yaderets V. V., Stytsenko T. S., Petrosyan M. A., Andryushina V. A. Synthesis and biological activity of synthetic 17α-hydroxyprogesterone derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46: 203–206.
7. Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Rybakov Y. L., Gukasov V. M., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Votyakov V. A., Shimanovskii N. L. HPLC-MS method for simultaneous quantitative determination of an innovative russian gestagen and its metabolites in rat and rabbit blood sera. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;52(12):1016–1020. DOI: 10.1007/s11094-019-01944-x.

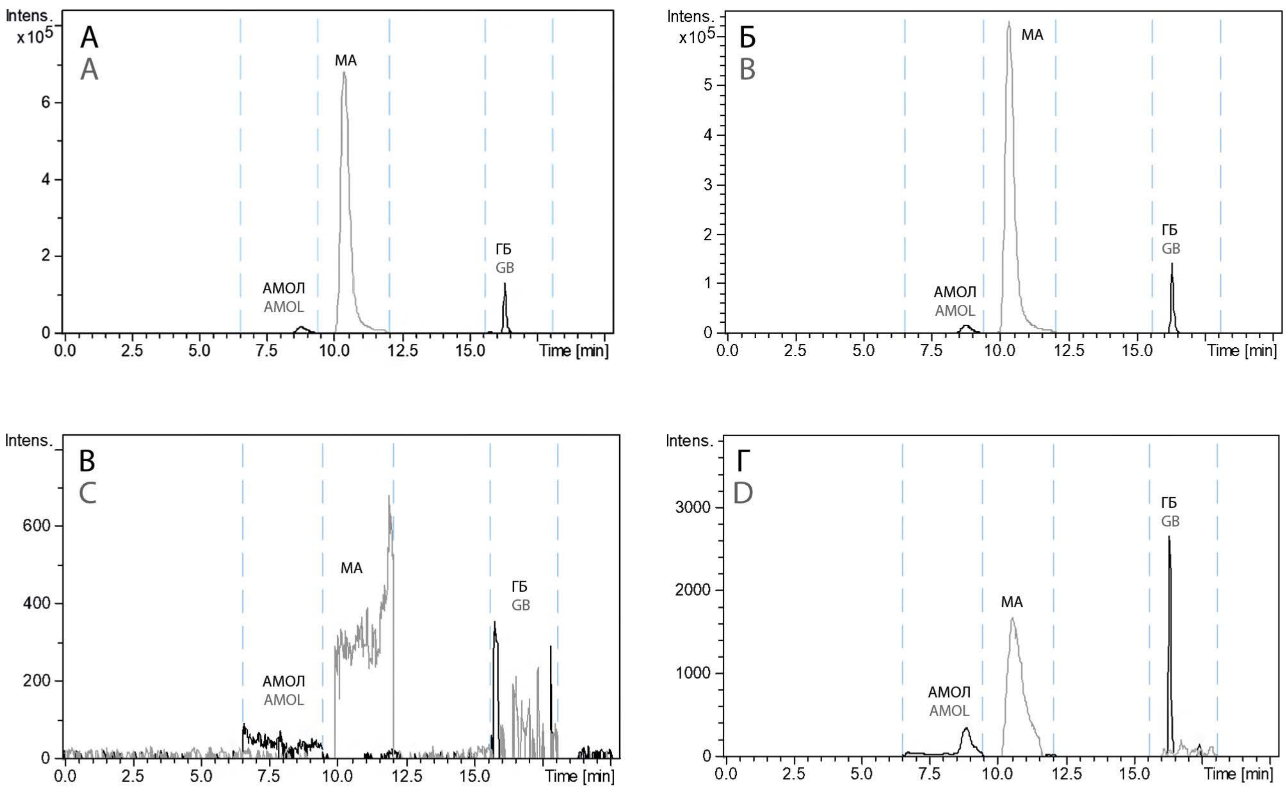


Рисунок 4. **Хроматограммы:**

А – стандартного раствора 1, разведенного в 30 раз ацетонитрилом; Б – сыворотки крови с добавкой стандартного раствора 1; В – интактной сыворотки крови; Г – сыворотки крови с добавкой стандартного раствора 2

Figure 4. **Chromatograms:**

A – standard solution 1, diluted 30 times with acetonitrile; B – blood serum with the addition of standard solution 1; C – intact blood serum; D – blood serum supplemented with standard solution 2

8. Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Shimanovsky N. L. Metabolism of Gestobutanoil, a Novel Drug of Progestin Group. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11(3):48–53. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.06.
9. Семейкин А. В., Федотчева Т. А., Свешникова Е. Д., Шилов Б. В., Смирнов А. С., Шимановский Н. Л. Цитостатическая активность и энергия лиганд-рецепторного взаимодействия нового отечественного гестагена гестобутаноила и его метаболитов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(11):3–8.
10. Schindler A. E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J. R., Schweppe K. W., Thijssen J. H. H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2008;61(1–2):171-80. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.013.

REFERENCES

1. Fülöp I., Vari C.-E., Miklos A., Imre S. LC-MS/MS ESI methods for the determination of oestrogens and androgens in biological matrix – a minireview. *Farmacia*. 2017;65(4):485–493.
2. Liu Q., Chi Q., Fan R.-T., Tian H.-D., Wang X. Quantitative-Profiling Method of Serum Steroid Hormones by Hydroxylamine-Derivatization HPLC–MS. *Natural Products and Bioprospecting*. 2019;9:201–208.
3. Shackleton C. Clinical steroid mass spectrometry: a 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(3–5):481–490. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.
4. Taylor A. E., Keevil B., Huhtaniemi I. T. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(2):D1–12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338.
5. Sheina N. I., Parshin V. A., Kolesnikova V. V., Myalina L. I., Sazonova L. P., Fedotcheva T. A., Shimanovskii N. L. Generative function of female rats upon intragastric administration of tablets of the new steroid drug gestobutanoil. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54:439–443. DOI: 10.1007/s11094-020-02219-6.
6. Zeinalov O. A., Yaderets V. V., Stytsenko T. S., Petrosyan M. A., Andryushina V. A. Synthesis and biological activity of synthetic 17α-hydroxyprogesterone derivatives. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46: 203–206.
7. Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Rybakov Y. L., Gukasov V. M., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Votyakov V. A., Shimanovskii N. L. HPLC-MS method for simultaneous quantitative determination of an innovative russian gestagen and its metabolites in rat and rabbit blood sera. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;52(12):1016–1020. DOI: 10.1007/s11094-019-01944-x.
8. Stepanova E. S., Makarenkova L. M., Chistyakov V. V., Fedotcheva T. A., Parshin V. A., Shimanovsky N. L. Metabolism of Gestobutanoil, a Novel Drug of Progestin Group. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019;11(3):48–53. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.06.
9. Semeikin A. V., Fedotcheva T. A., Sveshnikova E. D., Shilov B. V., Smirnov A. S., Shimanovsky N. L. Cytostatic activity and ligand-receptor interaction energy of the new gestagen drug gestobutanoil and its metabolites. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(11):3–8. (In Russ.)
10. Schindler A. E., Campagnoli C., Druckmann R., Huber J., Pasqualini J. R., Schweppe K. W., Thijssen J. H. H. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2008;61(1–2):171-80. DOI: 10.1016/j.maturitas.2008.11.013.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127
УДК 615.03

Check for updates

Оригинальная статья / Research article

Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

А. В. Алешина[1]*, Т. Н. Комаров[1,2], О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], Н. С. Багаева[1], В. В. Давыданова[1], А. Ю. Савченко[2], И. Е. Шохин[1,3]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
[2] ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31
[3] ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

***Контактное лицо:** Алешина Александра Вадимовна. **E-mail:** a.aleshina@cpha.ru

ORCID: А. В. Алешина – https://orcid.org/0000-0003-2611-501X; Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; В. В. Давыданова – https://orcid.org/0000-0003-2727-2148; А. Ю. Савченко – https://orcid.org/0000-0003-2734-5036; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Статья поступила: 29.03.2021 **Статья принята в печать:** 24.05.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Транексамовая кислота является одним из наиболее распространенных препаратов, применяемых для остановки кровотечений после травм, хирургических вмешательств и в гинекологии. Наиболее распространенным аналитическим методом определения данного соединения является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), однако из-за своей химической структуры данное соединение относится к группе так называемых слабоудерживаемых соединений, в связи с чем возникает необходимость разработки методики, позволяющей с наименьшими временными и ресурсными затратами, без использования специализированных колонок провести определение транексамовой кислоты в плазме крови человека.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических исследований.

Материалы и методы. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки использовали 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 транексамовой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100,00–15000,00 нг/мл в плазме крови. Аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения исследований фармакокинетики препаратов транексамовой кислоты.

Ключевые слова: транексамовая кислота, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, биоэквивалентность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, А. В. Алешина участвовали в разработке биоаналитической методики. Д. С. Щелгачева и В. В. Давыданова принимали участие в проведении валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин и А. Ю. Савченко отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Алешина А. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):120–127. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127

Development and Validation of Tranexamic Acid Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS method

Alexandra V. Aleshina[1]*, Timofey N. Komarov[1,2], Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Natalia S. Bagaeva[1], Veronika V. Davydanova[1], Alla Yu. Savchenko[2], Igor E. Shohin[1,3]

[1] LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31, Kashirskoe highway, Moscow, 115409, Russia
[3] Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

***Corresponding author:** Alexandra V. Aleshina. **E-mail:** a.aleshina@cpha.ru

ORCID: Alexandra V. Aleshina – https://orcid.org/0000-0003-2611-501X; Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001; Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Veronika V. Davydanova – https://orcid.org/0000-0003-2727-2148; Alla Yu. Savchenko – https://orcid.org/0000-0003-2734-5036; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630.

Received: 29.03.2021 **Revised:** 24.05.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Tranexamic acid is one of the most common drugs used to stop bleeding after trauma, in surgery and gynecology. The most common analytical method for the determination of this compound is reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). However, this compound belongs to the group of so-called poorly retained compounds due to its chemical structure. It is necessary to develop an analytical method that will allow the determination of tranexamic acid in human blood plasma with the least time, resource costs and without the use of specialized columns.

Aim. The aim of this study is to develop a method for tranexamic acid in human plasma by high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS) for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of tranexamic acid 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 effect and stability.

Conclusion. The method of the determination of tranexamic acid in human plasma was developed and validated by HPLC-MS/MS. The linearity in plasma sample was achieved in the concentration range of 100.00–15000.00 ng/ml. Method could be applied to tranexamic acid determination in plasma for pharmacokinetics and bioequivalence studies.

Keywords: tranexamic acid, plasma, HPLC-MS/MS, validation, bioequivalence

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Alexandra V. Aleshina have developed an analytical method. Dana S. Shchelgacheva, Veronika V. Davydanova have validated an analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin and Alla Yu. Savchenko 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: Aleshina A. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Savchenko A. Yu., Shohin I. E. Development and validation of tranexamic acid determination in human plasma by HPLC-MS/MS method. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):120–127. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-120–127

ВВЕДЕНИЕ

Транексамовая кислота (ТК) (tranexamic acid (TA) (рисунок 1) представляет собой препарат, оказывающий антифибринолитическое действие, обратимо блокируя сайты связывания лизина на плазминогене, тем самым предотвращая взаимодействие плазмина (который образуется в результате активации плазминогена) с остатками лизина на полимере фибрина и последующей деградацией фибрина [1]. Основными показаниями для применения транексамовой кислоты являются состояния с аномальным кровотечением или тенденциями к кровотечениям, в которых, как считается, участвует местный или системный гиперфибринолиз [2]. Также особое распространение транексамовая кислота получила в гинекологии в качестве негормонального препарата для лечения обильных менструальных кровотечений, для уменьшения кровотечения во время гинекологических операций, таких как абдоминальная миомэктомия или гистерэктомия [3]. Существуют данные о возможности применения транексамовой кислоты в качестве препарата от COVID-19 (coronavirus disease 2019) для некоторых групп пациентов. Противовирусный эффект связывают с теорией, согласно которой SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2), вирус, вызывающий COVID-19, становится более вирулентным, когда S-белок этого вируса расщепляется плазмином. Поэтому ингибирование плазмина может предотвратить прогрессирование COVID-19. В свою очередь транексамовая кислота, как типичный антифибринолитический препарат, снижает выработку плазмина [4]. В Российской Федерации транексамовая кислота входит в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что свидетельствует о значимости данного лекарственного препарата для отечественного здравоохранения [5].

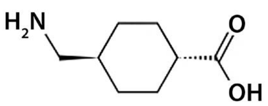


Рисунок 1. Структурная формула транексамовой кислоты

Figure 1. Chemical structure of tranexamic acid

По своему строению транексамовая кислота представляет собой транс-4-(аминометил)-циклогексанкарбоновую кислоту и является синтетическим аналогом аминокислоты лизина. За счет наличия карбоксильной группы данное соединение обладает гидрофильными свойствами, что иллюстрируется значениями коэффициента распределения октанол-вода (log *P*) для данного вещества (таблица 1).

Таблица 1. Log P и pKa для транексамовой кислоты

Table 1. Log P and pKa for tranexamic acid

	Транексамовая кислота Tranexamic acid
Log *P*	–1,6
pKa	4,56
Ссылка Reference	[6]

Известно, что физико-химические свойства лекарственных соединений в достаточной степени влияют на их фармакокинетику. Такая характеристика как гидрофильность/липофильность оказывает влияние на биодоступность лекарственного средства, а также влияет на поведение вещества в хроматографической системе. Однако в случае гидрофильных и полярных соединений, к которым в том числе относится и транексамовая кислота, при определении их методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращенно-фазовом режиме возникают трудности, вызванные тем, что данные вещества слабо удерживаются на классических октадецилсиликагельных колонках. Для решения практических задач по удерживанию слабоудерживаемых компонентов существуют различные подходы, такие как введение в состав подвижной фазы ион-парных добавок, использование колонок с низким процентным содержанием углерода, использование колонок с привитыми полярными радикалами, например циано-, амино- модификации силикагеля, или применение метода гидрофильной хроматографии [Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)] [7]. Однако не все приведенные выше подходы возможны к реализации на практике в условиях повседневной работы. Кроме того, зачастую аналитические лаборатории не всегда имеют в своем распоряжении полный ассортимент хроматографических колонок. В связи с этим возникает необходимость разработок хроматографических методик для слабоудерживаемых веществ с подбором оптимальных условий хроматографического разделения, детектирования, а также способа пробоподготовки.

На данный момент в рецензируемых журналах представлены различные методики определения транексамовой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора с тройным квадруполем (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)] в плазме или сыворотке крови человека (таблица 2).

Однако стоит отметить, что приведенные выше методики требуют трудозатратной пробоподготовки или подразумевают использование коррозионно-агрессивных реагентов для осаждения белков. В данном исследовании приведены разработка и валидация методики определения транексамовой кислоты методом ВЭЖХ с масс-селективным детектированием и использованием в качестве пробоподготовки осаждения белков ацетонитрилом, что позволяет облегчить и ускорить процедуру пробоподготовки, при этом получив методику, отвечающую всем требованиям нормативной документации.

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 транексамо-

Таблица 2. **Биоаналитические методики количественного определения транексамовой кислоты**

Table 2. **Bioanalytical methods of quantitative determination of tranexamic acid**

Аналитический метод Analytical method	**Пробоподготовка** Sample preparation	**Внутренний стандарт** Internal standart	**Аналитический диапазон** Analytical range	**Хроматографическая колонка** Chromatography column	**Ссылка** Reference
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение хлорной кислотой Protein precipitation by perchloric acid	Метилдопа Methyldopa	0,02 – 10,00 мкг/мл 0.02 – 10.00 µg/ml	XTerra™ MS C18 Column (100 × 2.1 mm, 3.5 µm)	[8]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Осаждение хлорной кислотой Protein precipitation by perchloric acid	цис-4-аминоциклогексан-карбоновая кислота cis-4-aminocyclohexane-carboxylic acid	1,00 – 200,00 мкг/мл 1.00 – 200.00 µg/ml	HyPURITY C18 Thermo Hypersil column (150 ×2.1 mm, 5 µm)	[9]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Удаление фосфолипидов и осаждение белков Ludox® AS-40 и хлоридом лантана Phospholipid clean-up and protein precipitation by Ludox® AS-40 and lanthanum chloride	цис-4-аминоциклогексан-карбоновая кислота cis-4-aminocyclohexane-carboxylic acid	1,00 – 1000,00 мкг/мл 1.00 – 1000.00 µg/ml	Thermo Scientific™ Accucore™ Urea HILIC HPLC Columns (150 ×3 mm, 2. µm)	[10]

вой кислоты (количественное содержание 99,3 %, Хуньань Дунтин Фармасьютикал Ко, Лтд., Китай) и вилдаглиптина (количественное содержание 99,8 %, Sigma-Aldrich, Германия).

Исходные стандартные растворы транексамовой кислоты и внутреннего стандарта (ВС) [internal standard (IS)] вилдаглиптина (ВИЛ) [vildagliptin (VIL)] готовили путем растворения навески субстанций в метаноле; рабочие стандартные растворы транексамовой кислоты и рабочий раствор ВС вилдаглиптина готовили путем разведения исходных растворов тем же растворителем до необходимых концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–8, а также уровням LLOQ (lower limit of quantification), L (low), M (middle) и H (high) (таблица 3).

Исходные и рабочие стандартные растворы хранили в морозильной камере при температуре –40 °C. Образцы интактной плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре –40 °C.

Пробоподготовка

К 200 мкл (калибровочного образца, образца контроля качества, образца интактной плазмы крови), помещённого в центрифужные микропробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 10 мкл рабочего раствора ВС вилдаглиптина, затем прибавляли 400 мкл ацетонитрила, перемешивали на встряхивателе типа «вортекс» в течение 10 секунд, далее центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 13500 об/мин. Далее супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Таблица 3. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и в образцах контроля качества

Table 3. Concentrations of analyte in calibration samples and in quality control samples

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analityte concentration, ng/ml	Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	ТК TA	ВИЛ VIL
1	100,00	500,00
2	250,00	500,00
3	500,00	500,00
4	1000,00	500,00
5	5000,00	500,00
6	8000,00	500,00
7	10000,00	500,00
8	15000,00	500,00
9	100,00	500,00
LLOQ	300,00	500,00
L	7500,00	500,00
M	12500,00	500,00
H	100,00	500,00

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 с прибавлением 0,08 % аммиака в метаноле (по объёму).
- Градиент по составу подвижной фазы (ПФ) представлен в таблице 4.

Таблица 4. Градиентное элюирование

Table 4. 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	12,5	87,5	1,00
0,50	12,5	87,5	1,00
2,50	12,5	87,5	1,00
2,60	12,5	87,5	1,30
3,00	100,0	0,0	1,30
4,00	100,0	0,0	1,30
4,20	12,5	87,5	1,30
4,70	12,5	87,5	1,00
7,50	12,5	87,5	1,00

- Объем вводимой пробы: 5 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–7,50 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 +4,5 кВ.
- Режим ионизации: положительный.

Таблица 5. Условия детектирования

Table 5. Detection conditions

Наименование аналита Analyte name	Условия детектирования Detection conditions		
Транексамовая кислота Tranexamic acid	158,10 → 55,10 m/z	158,10 → 67,10 m/z	158,00 → 95,20 m/z
Вилдаглиптин Vildagliptin	304,10 → 107,05 m/z	304,10 → 151,10 m/z	

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Главной особенностью разработки методики определения транексамовой кислоты являлась необходимость удержания гидрофильного, полярного вещества в условиях обращенно-фазовой хроматографии. При подборе оптимальной хроматографической колонки были испытаны колонки с привитыми амино- и цианогруппами, октильными группами, а также хроматографические колонки с октадецил модификацией силикагеля, содержащие различный процент углерода. Кроме того, в процессе разработки методики было испытано применение различных элюентов в качестве подвижной фазы, в том числе буферных систем.

На основании полученных экспериментальных данных в качестве неподвижной фазы была выбрана хроматографическая колонка Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм с содержанием углерода 9,5 % и обладающая малой остаточной силанольной активностью. Применение данной колонки в сочетании с раствором формиата аммония в качестве элюента позволило добиться оптимального удерживания на колонке, предотвратить размывание и добиться оптимальной формы хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе руководства по экспертизе лекарственных средств Том I [11], а также руководств FDA [12] и EMA [13] по следующим параметрам: селективность, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность (на уровнях внутри цикла, между циклов), 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 получения концентраций, соответствующих уровню LLOQ (таблица 3). 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 аналита и ВС, не превышают 20 % от сигнала аналита на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) и 5 % от сигнала ВС соответственно. Соответствующая хроматограмма приведена ниже на рисунке 2.

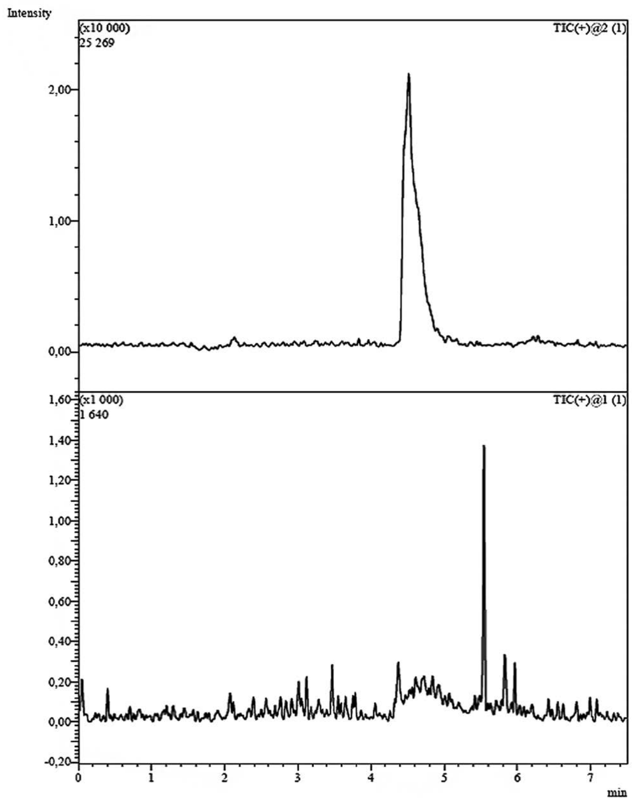


Рисунок 2. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 2. Blank plasma sample chromatogram

Эффект матрицы

Для оценки эффекта матрицы анализировали образцы с добавлением рабочих стандартных растворов транексамовой кислоты и рабочего раствора ВС вилдаглиптина без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме, без учёта влияния степени извлечения транексамовой кислоты из биологической матрицы.

Эффект матрицы был оценен на низком (уровень L) и высоком (уровень H) уровнях аналитического диапазона концентраций транексамовой кислоты (таблица 3). Для ВС вилдаглиптина эффект матрицы был рассчитан на уровне 500,00 нг/мл. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6. Расчёт фактора матрицы ТК, нормализованного по фактору матрицы ВС

Table 6. The matrix factor of TA, normalized by the IS matrix factor

	Интактная плазма крови Blank plasma		**Гемолизная интактная плазма крови** Hemolyzed blank plasma		**Гиперлипедимическая интактная плазма крови** Hyperlipedimic blank plasma	
	Нормализованный Mf (L) Normalized Mf (L)	**Нормализованный Mf (H)** Normalized Mf (H)	**Нормализованный Mf (L)** Normalized Mf (L)	**Нормализованный Mf (H)** Normalized Mf (H)	**Нормализованный Mf (L)** Normalized Mf (L)	**Нормализованный Mf (H)** Normalized Mf (H)
Среднее Average	1,25	0,92	1,45	1,03	1,37	1,04
CV, %	5,90	4,45	6,84	4,07	5,35	3,31

Калибровочная кривая

Проводили анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС вилдаглиптина и рабочих стандартных растворов транексамовой кислоты до концентраций, указанных в таблице 3 (уровни 1–8). По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика транексамовой кислоты к площади пика вилдаглиптина от отношения концентрации транексамовой кислоты к концентрации вилдаглиптина в плазме крови (рисунок 4). Хроматограмма образца на уровне 8 (таблица 3) представлена на рисунке 3.

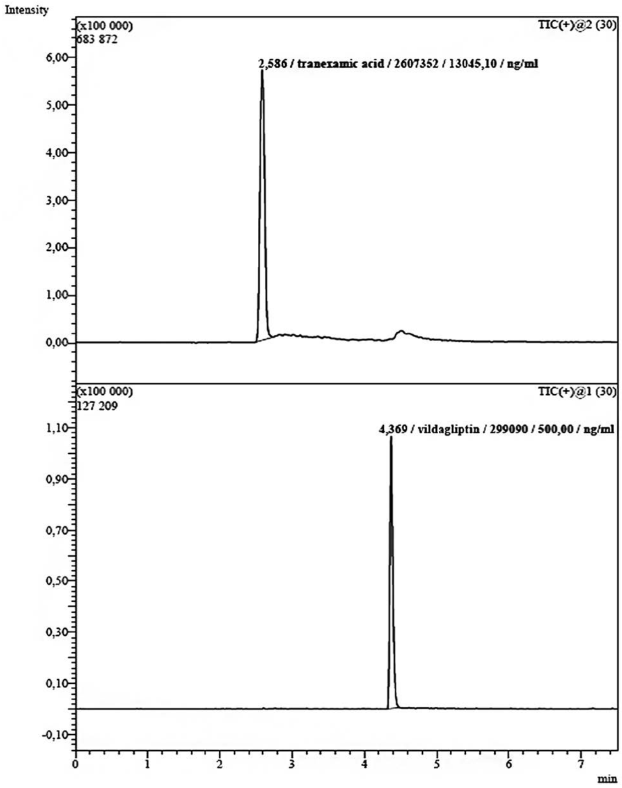


Рисунок 3. **Хроматограмма образца плазмы крови, уровень 8**

Figure 3. **Level 8 plasma sample chromatogram**

Точность и прецизионность

Проводили анализ образцов плазмы крови, соответствующих уровням LLOQ, L, M и H (таблица 3). 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 (RSD, прецизионность) и относительной погрешности (E, точность) соответствуют нормам (не более 20 % на уровне НПКО, не более 15 % – для остальных точек).

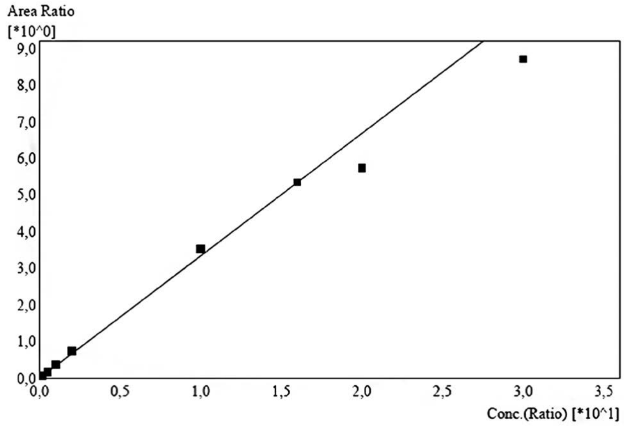


Рисунок 4. **Пример калибровочного графика зависимости отношения площади пика транексамовой кислоты к площади пика вилдаглиптина от отношения концентрации транексамовой кислоты к концентрации вилдаглиптина в плазме крови**

Figure 4. **Example of the calibration curve representing dependence of the ratio area peak of tranexamic acid to vildagliptin on the concentration ratio of tranexamic acid to the vildagliptin in plasma.**

Таблица 7. **Точность и прецизионность методики**

Table 7. **Accuracy and precision of the method**

Уровень Level	RSD, %			*E*, %		
	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)
LLOQ	3,17	6,05	3,75	–11,49	–6,77	–5,49
L	2,84	3,58	5,02	3,43	6,10	8,15
M	2,68	1,95	3,95	1,34	1,68	–0,30
H	0,79	2,20	4,50	–7,22	–5,97	–6,45

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 3), а также образцы контроля качества для оценки степени извлечения. Отдельно проводили анализ образцов интактной плазмы крови с гемолизом и с повышенным содержанием липидов. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8. **Оценка степени извлечения транексамовой кислоты на уровнях L, M, и H из различных видов биологической матрицы**

Table 8. **Calculation of tranexamic acid recovery at L, M, H levels from different types of biological matrix**

	СИ (уровень L), % Recovery (level L), %	**СИ (уровень M), %** Recovery (level M), %	**СИ (уровень H), %** Recovery (level H), %
Среднее Average	58,35	83,43	67,87
SD	6,88	2,23	6,24
RSD	11,80	2,67	9,19

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 транексамовой кислоты в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение транексамовой кислоты со значениями RSD и E не более 20 %. НПКО составил 100,00 нг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием транексамовой кислоты на уровне НПКО приведена на рисунке 5. Отношение сигнал/шум по пику транексамовой кислоты на уровне НПКО, рассчитанное при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония), составляет 28,3.

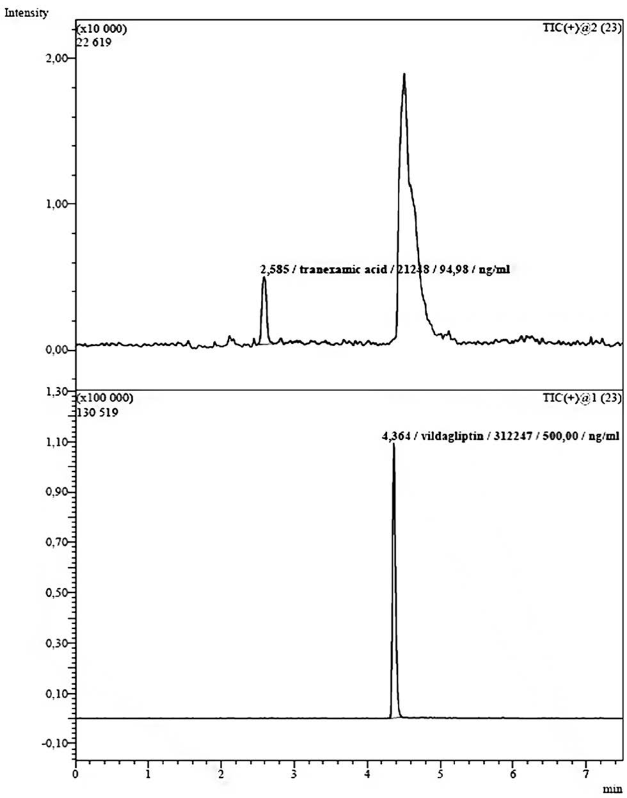


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови, уровень НПКО

Figure 5. LLOQ plasma sample chromatogram

Стабильность

Были подтверждены краткосрочная стабильность («настольная» и «постпрепаративная»), стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, стабильность исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 16 дней при температуре –40 °С), долгосрочная стабильность (при хранении в течение 71 дня при температуре –40 °С) исследуемых веществ на низком (L) и высоком (H) уровнях концентраций (таблица 3).

Перенос пробы

При последовательном анализе калибровочного образца, соответствующего уровню 8 (см. таблицу 3), и образца интактной плазмы крови на хроматограмме образца интактной плазмы крови отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания пикам исследуемого вещества и ВС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика определения транексамовой кислоты в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека. Полученный аналитический диапазон позволяет применить разработанную методику для проведения аналитической части исследований фармакокинетики препаратов транексамовой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dunn C. J., Goa K. L. Tranexamic acid. *Drugs*. 1999;57(6):1005–1032.
2. Ng W. Ch. K., Jerath A., Wasowicz M. Tranexamic acid: a clinical review. *Anestezjologia Intensywna Terapia*. 2015;47(4):339–350. DOI: 10.5603/AIT.a2015.0011.
3. Klebanoff J. S., Marfori Ch. Q., Ingraham C. F., Wu C. Z., Moawad G. M. Applications of Tranexamic acid in benign gynecology. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2019;31(4):235–239. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000547.
4. Ogawa H., Asakura H. Consideration of tranexamic acid administration to COVID-19 patients. *Physiological reviews*. 2020; 100(4):1595–1596. DOI: 10.1152/physrev.00023.2020.
5. Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р. «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2020 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/563469457. Ссылка активна на 12.05.2021.
6. Tranexamic acid. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00302. Accessed: 25.02.2021.
7. Карцова Л. А., Бессонова Е. А., Сомова В. Д. Применение ионных жидкостей на основе имидазола в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии при разделении полярных лекарственных препаратов. В сб.: III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 21–27 мая 2017. Краснодар: Мегастронг; 2017. С. 15. Доступно по: http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F2017.pdf. Ссылка активна на 12.05.2021.
8. Chang Q., Yin O. Q. P., Chow M. S. S. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tranexamic acid in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004;805(2):275–280. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.03.013.
9. Delyle S. G., Abe E., Batisse A., Tremey B., Fischler M., Devillier P., Alvarez J. C. A validated assay for the quantitative analysis of tranexamic acid in human serum by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5–6):438–443. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.005.
10. Fabresse N., Fall F., Etting I., Devillier P., Alvarez J.-C., Grassin-Delyle S. LC–MS/MS determination of tranexamic acid in human plas-

ma after phospholipid clean-up. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;141;149–156. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.024.
11. Миронов А. Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К; 2013. 280 с.
12. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed: 25.02.2021.
13. Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation. Accessed: 25.02.2021.

REFERENCES

1. Dunn C. J., Goa K. L. Tranexamic acid. *Drugs*. 1999;57(6):1005–1032.
2. Ng W. Ch. K., Jerath A., Wasowicz M. Tranexamic acid: a clinical review. *Anestezjologia Intensywna Terapia*. 2015;47(4):339–350. DOI: 10.5603/AIT.a2015.0011.
3. Klebanoff J. S., Marfori Ch. Q., Ingraham C. F., Wu C. Z., Moawad G. M. Applications of Tranexamic acid in benign gynecology. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2019;31(4):235–239. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000547.
4. Ogawa H., Asakura H. Consideration of tranexamic acid administration to COVID-19 patients. *Physiological reviews*. 2020; 100(4):1595–1596. DOI: 10.1152/physrev.00023.2020.
5. *Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 12 oktyabrya 2019 g. № 2406-r. "Ob utverzhdenii perechnya zhiznenno neobkhodimykh i vazhneyshikh lekarstvennykh preparatov na 2020 god, a takzhe perechney lekarstvennykh preparatov dlya meditsinskogo primeneniya i minimal'nogo assortimenta lekarstvennykh preparatov, neobkhodimykh dlya okazaniya meditsinskoy pomoshchi"* [Order of the Government of the Russian Federation of 12 October 2019 No. 2406-r. "On approval of the list of vital and essential drugs for 2020, as well as lists of drugs for medical use and the minimum range of drugs required for the provision of medical care"]. Available at: https://docs.cntd.ru/document/563469457. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
6. Tranexamic acid. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB00302. Accessed: 25.02.2021.
7. Kartsova L. A., Bessonova E. A., Somova V. D. *Primenenie ionnykh zhidkostey na osnove imidazola v usloviyakh obrashchenno-fazovoy i gidrofil'noy khromatografii pri razdelenii polyarnykh lekarstvennykh preparatov. V sb.: III Vserossiyskaya konferentsiya "Analiticheskaya khromatografiya i kapillyarnyy elektroforez"* [The use of ionic liquids based on imidazole under conditions of reversed-phase and hydrophilic chromatography in the separation of polar drugs. In: III All-Russian conference "Analytical chromatography and capillary electrophoresis"]. May 21–27 2017. Krasnodar: Megastrong; 2017. P. 15. Available at: http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/%D0%90%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F%20%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%8F2017.pdf. Accessed: 12.05.2021. (In Russ.)
8. Chang Q., Yin O. Q. P., Chow M. S. S. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of tranexamic acid in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2004;805(2):275–280. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.03.013.
9. Delyle S. G., Abe E., Batisse A., Tremey B., Fischler M., Devillier P., Alvarez J. C. A validated assay for the quantitative analysis of tranexamic acid in human serum by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(5–6):438–443. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.005.
10. Fabresse N., Fall F., Etting I., Devillier P., Alvarez J.-C., Grassin-Delyle S. LC–MS/MS determination of tranexamic acid in human plasma after phospholipid clean-up. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;141;149–156. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.024.
11. 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.)
12. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry. Accessed: 25.02.2021.
13. Bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation. Accessed: 25.02.2021.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-128-135
УДК 615.11

Обзорная статья / Review article

История создания VII Государственной фармакопеи СССР (обзор)

К. С. Гузев*

АО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды» (АО «Ретиноиды»), 143983, Россия, Московская обл., мкр. Керамик, г. Балашиха, ул. Свободы, д. 1А, офис 404

***Контактное лицо:** Гузев Константин Сергеевич. **E-mail:** guzev3@yandex.ru

ORCID: К. С. Гузев – https://orcid.org/0000-0002-4001-8980.

Статья поступила: 22.01.2021 **Статья принята в печать:** 01.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Показана объективная необходимость появления этого свода законов для фармацевтической отрасли. Приведены доказательства готовности всех отраслей фармации к разработке текста фармакопеи с учетом современных международных требований, предъявляемых к научной и практической деятельности в области разработки, изготовления и производства лекарственных средств.
Текст. В работе представлена история создания VII издания Государственной фармакопеи СССР. Описана последовательность шагов по формированию Фармакопейной комиссии, этапы ее деятельности по подготовке обновленного текста фармакопеи, приведен подробный анализ подготовленного текста в сравнении с действующей Фармакопеей VI издания (1910 г.). Процитированы различные точки зрения специалистов на содержание основного текста, послужившие базой нового документа. Оценена роль отечественных ученых-фармацевтов в разработке и публикации VII издания Государственной фармакопеи СССР.
Заключение. Подчеркнута роль Фармакопейной комиссии в своевременной разработке текста нового издания Государственной фармакопеи. Отмечен факт широкого ее обсуждения среди экспертов и новизна подхода, давшего мощный толчок для развития всей отрасли.

Ключевые слова: Российская фармакопея, Фармакопейная комиссия, фармацевтическое сообщество, новые подходы, сравнительный анализ текста

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Автор единолично продумывал концепцию статьи, проводил поиск и сбор фактического материала в Государственном архиве экономики РФ и библиотеках г. Москвы, самостоятельно писал текст и оформлял его в соответствии с общемедицинским профилем журнала.

Для цитирования: Гузев К. С. История создания VII Государственной фармакопеи СССР. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):128–135. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-128-135

The History of the Creation of the VII State Pharmacopoeia of the USSR (Review)

Konstantin S. Guzev*

JSC Pharmaceutical Research and Production enterprise "Retinoids", 1A/404, Svobody str., Balashikha, Microdistrict Keramik, Moscow region, 143983, Russia

***Corresponding author:** Konstantin S. Guzev. **E-mail:** guzev3@yandex.ru

ORCID: Konstantin S. Guzev – https://orcid.org/0000-0002-4001-8980.

Received: 22.01.2021 **Revised:** 01.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. The objective necessity of the appearance of this code of laws for the pharmaceu-tical industry is shown. The proofs of the readiness of all branches of pharmacy to develop the text of the Pharmacopoeia, taking into account modern international requirements for scientific and practical activities in the development, manufacture and production of medicines, are presented.
Text. The work presents the history of the creation of the VII edition of the State Pharmacopoeia of the USSR. The sequence of steps for the formation of the Pharmacopoeia Commission, the stages of its activities for the preparation of the updated text of the Pharmacopoeia is described, a detailed analysis of the prepared text is given in comparison with the current Pharmacopoeia of the VI edition (1910). Various points of view of experts on the content of the main text are cited, which served as the basis for the new document. The role of domestic scien-tists-pharmacists in the development and publication of the VII edition of the State Pharmacopoeia of the USSR is evaluated.
Conclusion. The role of the Pharmacopoeia Commission in the timely development of the text of the new edition of the State Pharmacopoeia is emphasized. The fact of its wide discussion among experts and the novelty of the approach, which gave a powerful impetus to the development of the entire industry, are noted.

Keywords: Russian Pharmacopoeia, Pharmacopoeia Commission, pharmaceutical community, new approaches, comparative analysis of the text

Conflict of interest. The author declares that he has no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The author single-handedly thought over the concept of the article, searched and collected factual material in the State Archive of the Economy of the Russian Federation and libraries in Moscow, independently wrote the text and designed it in accordance with the general medical profile of the journal.

For citation: Guzev K. S. The history of the creation of the VII State Pharmacopoeia of the USSR. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):128–135. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-128-135

ВВЕДЕНИЕ

Чем дальше от нас уходит XX в., тем сложнее находить факты, свидетельствующие о действиях государственной власти и отдельных людей по организации работы стратегически важной отрасли российской промышленности – фармацевтической – во всех ее проявлениях. В то же время прошедший с тех пор столетний период позволяет понять и оценить значение совершенных действий.

Выпуск первой Фармакопеи СССР VII издания имел важное общегосударственное значение, так как он не только показывал зрелость отечественной фармацевтической науки, фармацевтического образования, аптечного дела и фармацевтической промышленности, но и свидетельствовал о серьезном отношении государства к проблеме лекарственного обеспечения населения страны. К 1925 году фармацевтическое сообщество нового Российского государства уже не могло пользоваться Фармакопеей 1910 года. Большинство стран Европы к тому времени уже пересмотрели свои фармакопеи: к 1925 году увидели свет очередные издания Британской (1914), дополнение к Германской (1916), Финляндской (1914), дополнение к Французской (1920), Испанской (1915), Итальянской (1920), Северо-Американских Соединенных Штатов (1916), Японской (1922), Бельгийской (1912), Швейцарской (1924) фармакопей [1]. С 1923–1924 годов в СССР на постоянной основе стали выпускаться два новых фармацевтических профессиональных журнала: «Фармацевтический вестник» и «Химико-фармацевтический журнал» [2]. К 1925 г. уже состоялись съезды химиков (Менделеевский химический съезд, 26 мая 1922 г., Петроград), аптечных работников (III-й съезд аптекоработников, 15–19 ноября 1924 г.), оформились и начали работать первые фармацевтические вузы и образовательные учреждения среднего звена (Московский и Петроградский фармацевтические институты, Пермское химико-фармацевтическое отделение при Пермском госуниверситете, фармацевтические училища в крупных городах СССР). В первой половине 20-х годов при научно-техническом отделе ВСНХ успешно работали научно-технические институты, относящиеся к химической промышленности:

1. Химический институт им. Карпова (Москва).
2. Институт прикладной химии с опытным заводом (Петроград).
3. Научный химико-фармацевтический институт (Москва).
4. Государственный научно-технический институт (ГОНТИ, Петроград).
5. Институт прикладной минералогии (Москва).
6. Институт удобрений (Москва).
7. Электротехнический институт (Москва).
8. Институт прикладной физики (Москва).
9. Техно-физический институт (Петроград).
10. Аэродинамический институт (Москва).
11. Главная палата мер и весов (Петроград).
12. Гидравлическая лаборатория при Тимирязевской сельскохозяйственной академии (Москва).
13. Институт силикатов (Москва).
14. Институт прикладной механики (Петроград) [3].

Оформились требования к фармацевтическому образованию (Съезд по фармацевтическому образованию, 27–30 декабря 1924 г.; первое Всесоюзное совещание по фармобразованию, 1925 г.) [4]. В столицах союзных республик и крупных городах РСФСР вновь организовывались научно-фармацевтические кружки (общества). Российские ученые стали принимать участие в международных конференциях (Вторая международная конференция по унификации правил о сильнодействующих лекарственных веществах, Брюссель, 21–29 сентября 1925 г.) [5]. К 1925 г. начала подниматься с колен отечественная фармацевтическая промышленность и сформировалась российская система управления производством и закупкой за рубежом оборудования, сырья и готовых лекарственных средств (АО «Госмедторгпром») [6–8]. Остро вставала проблема согласования требований качества к лекарственным товарным позициям в СССР и за рубежом. Разрешить эту проблему было возможно только при условии согласования требований к сырью, субстанциям и готовым лекарственным препаратам между Россией и странами Европы. В этом могло помочь новое издание Фармакопеи.

Таким образом, к 1925 г. в СССР была создана межотраслевая система, охватывающая все сферы фармацевтической деятельности, которая и должна была завершиться выпуском нового VII издания Государственной фармакопеи СССР.

Цель работы состоит в том, чтобы, основываясь на архивных материалах и данных, представленных в открытой печати, объективно описать последовательность разработки и выхода в свет VII издания Государственной фармакопеи СССР.

РАБОТА НАД ФАРМАКОПЕЕЙ

Первые упоминания о необходимости разработки новой версии Фармакопеи нового Российского государства относятся к 1919 г. Так, коллегия Главного управления государственными химико-фармацевтическими заводами («Главфармзав») в одном из своих докладов рекомендовала: *«Разработать русифицированную версию Всероссийской Фармакопеи в отношении лекарственных растений, в смысле замены растений, культивируемых за границей, близкими видами дикорастущих растений России. Развить опытные посадки лекарственных растений в разных районах. Организовать химическое и физиологическое исследование культивируемых и собираемых растений»* [9]. В 1920 г. по инициативе той же организации была создана специальная комиссия, на пленарном заседании которой был поднят вопрос о выпуске новой Советской Фармакопеи. Для этого были выделены наиболее важные отечественные препараты, изменены некоторые прописи, введены рецептурные формы изготовления дозированных лекарств в массовом масштабе [10].

Для решения вопроса по разработке очередного издания Фармакопеи весной СССР 1923 г. Народный комиссариат здравоохранения сформировал специальное бюро. Бюро наметило план и программу подготовки нового издания Фармакопеи, которая должна быть составлена по новейшим данным и соответствовать современным научным и практическим требованиям медицины и фармации. Для рассмотрения этого плана была создана Фармакопейная комиссия из видных деятелей отечественной медицинской и фармацевтической науки и практики (проф. А. Е. Чичибабин, проф. В. В. Николаев, проф. Д. М. Щербачёв, проф. Н. П. Кравков, проф. А. И. Зильберберг и др.). Комиссию планировалось собирать 1 раз в 2 месяца для обсуждения накопленного материала. Первая сессия Комиссии состоялась 15–16 июня 1923 г. На ней эксперты «…обратились с письмом во все руководящие медицинские государственные учреждения, ко всем учебным и общественным организациям и отдельным лицам, соприкасающимся с медицинской и фармацевтической деятельностью, с просьбой принять участие в государственном деле издания Фармакопеи». Подчеркивая важность работы над новым изданием Государственной фармакопеи, члены Комиссии отмечают: *«Если роль Фармакопеи была значительна в довоенное время, при более или менее налаженном аппарате контроля, при определенности и устойчивости рынка, легкого получения лекарственных средств от солидных и крупных фирм, то теперь, после европейской и гражданской войн, после блокады еще не изжитой вполне, при наводнении рынка фальсифицированными средствами, издание новой Фармакопеи является актом первенствующего значения для правильной медицинской и лекарственной помощи населению»*. На заседании были тщательно рассмотрены статьи последнего VI издания Фармакопеи (1910 г.), запланированы их изменения, пересмотрен список важнейших новых средств, которые следует ввести в новое издание, и перечень устаревших препаратов, которые необходимо изъять из документа [11].

Более того, в российском профессиональном сообществе предлагалась идея единой Международной фармакопеи, которая была реализована после издания Всемирной организацией здравоохранения лишь в 1951 (I том) и 1955 гг. (II том). Так, сотрудник Научного химико-фармацевтического института ВСНХ Д. Попов, участвующий в обсуждении нового издания Фармакопеи СССР, пишет: *«В связи с изменившейся техникой приведения лекарственного сырья к форме, готовой для употребления, с переносом заготовки многих лекарственных форм из аптек на фабрики, с введением дозированных средств и другими достижениями в этой области, должен измениться и характер новой Фармакопеи. Говоря и об обновлении прежней Фармакопеи и о приведении ее в согласие с современной наукой, говорят и о полной реформе фармацевтической отрасли. В обоих случаях лучшим выходом было бы издание общей, согласованной для всех стран Фармакопеи, в которой на единой научной основе выделялись бы особенности каждой страны»* [12].

На подготовку к печати первой Советской Фармакопеи был отпущен год с небольшим. Во время работы над новым изданием было предпринято широкое обсуждение ее содержания среди научных и практических слоев фармацевтического сообщества. Так, в первом номере журнала «Всероссийский фармацевтический вестник» за 1923 г. в разделе «Из заграничной литературы» сотрудники редакционной коллегии представили статью, содержание которой раскрывало основные принципы по пересмотру текста новой Швейцарской фармакопеи. Основное условие, которое было поставлено перед Медицинским советом Швейцарии (Schwetzerischer Gesundheistrat), состояло в том, чтобы скелет Фармакопеи, то есть ее отделы, порядок изложения статей и прочее остались прежними, но все статьи должны быть основательно пересмотрены и, если нужно, переделаны.

За образец новой Фармакопеи Швейцарии была принята концепция, предложенная профессором А. Чирхом (A. Tschirch). Автор статьи предлагал: при описании характерных реакций (подлинности) не описывать все возможные реакции. Достаточно одной, если она убедительна. При рекомендации этих реакций надо отдавать предпочтение тем, которые проводятся с минимальным количеством вещества и на наиболее простом оборудовании. При испытании веществ на чистоту – не требовать искать примеси, которых там нет и быть не может. Количество титрованных растворов в фармакопее должно быть минимально. Чаще других в анализе веществ использовать микроанализ и метод сублимации. При исследовании препаратов на железо необходимо использовать один метод. При определении алкалоидов весовой метод должен быть заменен на объемный. При приготовлении растворов пользоваться нормальным литром, а работы проводить при 15 °С. Термометры, которыми определяют температуру кипения и плавления, должны быть проверены по нормальному термометру. Список индикаторов должен быть обновлен. Не требовать от аптеки, чтобы в ее распоряжении были все физические приборы (тонометр, рефрактометр, поляриметр и пр.). Из препаратов в Фармакопею должны быть приняты только те, которые имеют строгий состав, определенную характеристику и могут быть проверены. Фармакологическую проверку сывороток передать фармакологам. Необходимо предусмотреть способ проверки препаратов мышьяка. Физиологический раствор поваренной соли должен быть заменен на более современный. Необходимо также пересмотреть содержание таблиц доз сильнодействующих веществ и ядов, реактивов и несовместимостей, а также требования к медицинским винам и перевязочному материалу. Способы химического приготовления препаратов должны быть описаны самым тщательным образом. Патентованных препаратов следует избегать, заменяя их изученными средствами. При описании химических веществ приводить их формулы. При описании препаратов из лекарственного растительного сырья указывать примеси. Раздел, обозначающий количество золы, должен быть расширен, при наличии в сырье дубильных веществ он должен быть заменен формальным числом, а при наличии сапонинов – числом агглютинации. При приготовлении препаратов из растительного сырья надо указать условия, при которых происходит максимальный выход действующих веществ. В заключении профессор А. Чирх пишет, что все перечисленные им рекомендации должны быть обязательно подвержены критике и только после этого помещены в текст новой фармакопеи [13]. Как видно, автор статьи высказывает свою точку зрения на то, что бы он хотел видеть в новом издании Фармакопеи свой страны.

Ниже мы приводим иную точку зрения, содержащую в сжатой форме анализ недостатков Российской фармакопеи VI издания (1910 г.), которые необходимо будет обязательно учесть при составлении нового ее издания. Так, Фармакопея 1910 г. разбита на несколько частей, фактически не согласующихся между собой. Общие статьи не отвечают современному состоянию фармацевтической науки. Ряд прописей Фармакопеи необходимо согласовать с международными принятыми нормами. Российская фармакопея должна уделять больше внимания отечественным лекарственным растениям и продуктам, по возможности, заменяя ими продукты заграничного происхождения. Коренного пересмотра требуют прописи Мануала (приложения к таксе) как в отношении номенклатуры, так и в отношении составов некоторых прописей. Следует пересмотреть таблицы максимальных доз (как для врачей, так и для аптекарей), а также перечень приборов, используемых как при анализе лекарств, так и в отношении оснащения аптек. Необходимо внести в Фармакопею общие статьи о бактерийных и органопрепаратах. Следует пополнить Фармакопею новыми материалами, прочно нашедшими свое место в медицине. Серьезно пересмотреть тексты некоторых статей, так как в них встречаются ошибки, до сих пор перепечатываемые из одного издания в другое. Необходимо ввести при описании галеновых препаратов их максимальные выходы (по образу Военной фармакопеи). Кроме списков «А», «Б» и «В» ввести перечень препаратов, которые по прошествии некоторого времени могут быть заменены свежими. Фармакопея должна быть издана в двух томах. Том 1 должен содержать «Общие статьи» и прописи изготовления всех препаратов, как галеновых, так и химических, а также общую инструкцию по заготовке лекарственных растений и органов животных, по изготовлению сывороточных, бактерийных и органопрепаратов. Том 2 – предназначенный для аптек – должен содержать описание всех (готовых) лекарственных материалов, методики исследования их чистоты и количества, а также все прочие методики, относящиеся к хранению и отпуску лекарств. В Фармакопею должна быть включена «Инструкция» для фармацевта, преподающая обязательные общие принципы изготовления и отпуска лекарств. В Фармакопею следует включить таблицы противоядий, растворимости всех официальных препаратов в воде, спирте, эфире, глицерине и маслах [14].

Поддерживая, в целом, мнение профессора А. Чирха, Д. Попов предлагает обратить особое внимание в новом издании отечественной Фармакопеи и на другие проблемные вопросы:

- после соответствующей доработки и стандартизации сырья попытаться заменить дорогостоящий опий на экстракт мака;
- невозможно осуществить замену препаратов спорыньи на иные средства;
- невозможно осуществить замену иностранных медикаментов отечественными аналогами, а американских – европейскими следовало бы в настоящее время поддержать только в случае их действительно полноценной фармакологической замены;
- при изучении галеновых препаратов Фармакопея должна побуждать к творчеству и указывать новые пути повышения их качества;
- необходимо окончательно решить вопрос об использовании свежего растительного сырья;
- следует избегать цитирования и отсылок к фармакопеям других стран. Следует стремиться ввести в наше издание больше современных, согласованных с международным сообществом, требований.

В заключение статьи автор пишет: *«Более научный подход, больше места химическому анализу и фармакологическому исследованию, более строгая научная критика во всех случаях. Однако требовать нужно только того, что выполнимо»* [12].

Таким образом, анализ опубликованных материалов, посвященных содержанию новой Российской фармакопеи, свидетельствует, что это издание будет учитывать и опыт зарубежных исследователей, и опыт отечественных ученых и практиков.

Наиболее полный разбор предложений, касающихся содержания будущей Фармакопеи СССР, делает Б. Н. Салтыков. Его анализ составлен на основе протоколов Фармакопейной комиссии и докладов председателя этой комиссии профессора А. Е. Чичибабина в коллегии Наркомздрава и представлен в пяти номерах журнала. В этих работах автор перечислил основные принципы, которыми руководствовалась Фармакопейная комиссия при работе с материалом.

Так, при составлении новой Фармакопеи Комиссия должна:

- руководствоваться исключительно научными соображениями;
- избегать чрезмерного повышения требований;
- использовать новую химическую номенклатуру и помещать в текст химические формулы веществ;
- строго придерживаться плана построения статей химических препаратов;
- придерживаться принятого Комиссией описания растительных препаратов;
- ввести в текст физиологические методы исследования для раствора адреналина, сердечных гликозидов, спорыньи и ее препаратов;
- рекомендовать использование микрокристаллических реакций;
- учесть современные требования к серологическим препаратам;
- ввести в текст Фармакопеи перечень органотерапевтических препаратов щитовидной железы, вилочковой железы, гипофиза, адреналина, яичников, молочной железы и инсулина, а также антитиреоидин;
- учесть, что новая Фармакопея должна принимать во внимание нужды ветеринарии;
- ввести в текст Фармакопеи описание средств для рентгенографии, фотографии, приготовления питательных сред и пр., а также для колониальных товаров (перец, корица, шафран и пр.), применяемых в качестве диетических продуктов;
- завершить основной текст Фармакопеи Приложениями, такими как:
    1) правила хранения в аптеке сильнодействующих и ядовитых веществ;
    2) «список А»: ядовитые врачебные средства, которые должны храниться в аптеке под замком;
    3) «список Б»: сильнодействующие средства, которые должны храниться в аптеке с предосторожностью;
    4) тблицы атомных весов;
    5) реактивы и растворы для качественных определений;
    6) титрованные растворы;
    7) индикаторы;
    8) правила взятия средней пробы для анализа;
    9) общие реакции на мышьяк, тяжелые металлы, галоиды, серную кислоту;
    10) количественное определение золы;
    11) определение числа омыления;
    12) определение кислотного числа;
    13) определение йодного числа;
    14) определение спирта в галеновых препаратах;
    15) определение точки плавления и затвердевания;
    16) определение точки кипения;
    17) таблицы процентного содержания серной, соляной и азотной кислот по удельному весу;
    18) таблицы удельного веса спирта различной концентрации;
    19) таблицы разведения спирта;
    20) вес капель;
    21) шаблоны для пластырей;
- ввести в основной текст Фармакопеи таблицы нерациональных с химической точки зрения смесей;
- поместить в Фармакопею правила оказания первой медицинской помощи при отравлении и таблицы противоядий [1, 15–17].

Кроме того, после всестороннего обсуждения Фармакопейная комиссия единогласно постановила включить в ее текст 103 новые статьи и исключить из текста вино, обязать проводить приготовление экстрактов только в вакуум-аппаратах, провести все необходимые исследования и ввести в текст Фармакопеи материалы по валоризации физиологических исследований, дозы наркотических и сильнодействующих веществ представлены из расчета на взрослого человека в возрасте 25 лет, когда он достиг наибольшего развития [18].

В течение 1924 г. работа Фармакопейной комиссии по подготовке основного текста нового VII издания Государственной фармакопеи СССР была закончена. Для того чтобы оценить проделанную работу, Б. Н. Салтыков провел и представил в «Химико-фармацевтическом журнале» сравнительное исследование содержания VI и VII изданий Фармакопей. В работе автор указывает на 46 значимых изменений, которые в корне поменяли научный и практический уровни нового VII издания [19]. В этом же номере журнала была опубликована редкая фотография членов Фармакопейной комиссии (рисунок 1).

В начале 1925 г. была проведена кампания по определению тиража новой Фармакопеи, в результате которой он был определен в размере 8 тыс. экземпляров (рисунок 2).

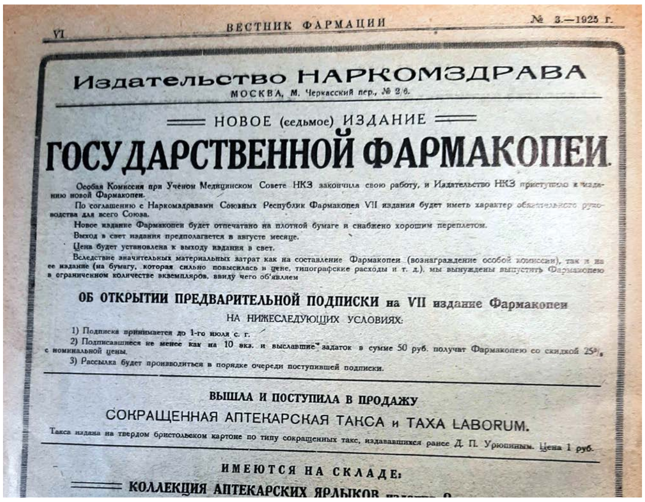
Первый выпуск VII Государственной фармакопеи СССР появился в 1925 году (рисунок 3). Она была издана Народным комиссариатом здравоохранения РСФСР по согласованию с Наркоздравами союзных республик. Во введении члены Фармакопейной комиссии писали: *«Последнее (VI) издание Российской фармакопеи (гражданской) было напечатано в 1910 году, а последнее издание Российской военной фармакопеи (III) – в 1913 году. За истекший, более чем десятилетний, период времени, благодаря быстрому прогрессу научных дисциплин, имеющих отношение к лекарственному делу, оба издания во многих пунктах устарели и требовали значительных изменений. При том же оба названных издания давно разошлись, что не могло не создать больших затруднений для контроля над доброкачественностью медикаментов, которыми снабжается население СССР. Ввиду этого для Народного комиссариата здравоохранения представлялось совершенно необходимым принять меры*

Рисунок 1. Пленарное собрание Фармакопейной комиссии (6–7 декабря 1924 г.)

***1-й ряд (слева направо)*: М. С. Хаймович, Н. А. Савельев, Н. А. Валяшко, Л. Ф. Ильин, А. С. Гинсберг, М. И. Галенкин, Н. М. Карнилов, Н. А. Сошественский.**
***2-й ряд (слева направо сидят)*: П. Н. Диатропов, И. И. Иванов, Д. М. Щербачёв, Е. И. Марухес, Л. А. Тарасевич, А. Е. Чичибабин, А. И. Зилберберг, В. Н. Николаев, В. С. Гулевич, А. В. Могилевский, Б. Н. Салтыков, В. Г. Колоколов.**
Фото из «Химико-фармацевтического журнала», 1925, № 1

Figure 1. Plenary meeting of the Pharmacopoeial Commission (December 6–7, 1924)

***1st row (left to right)*: M. S. Khaimovich, N. A. Saveliev, N. A. Valyashko, L. F. Ilyin, A. S. Ginsberg, M. I. Galenkin, N. M. Karnilov, N. A. Soeshestsky.**
***2nd row (from left to right sitting)*: P. N. Diatropov, I. I. Ivanov, D. M. Shcherbachev, E. I. Marukhes, L. A. Tarasevich, A. E. Chichibabin, A. I. Zilberberg, V. N. Nikolaev, V. S. Gulevich, A. V. Mogilevsky, B. N. Saltykov, V. G. Kolokolov.**
Photo from "Chemical and Pharmaceutical Journal", 1925, no. 1



VI ВЕСТНИК ФАРМАЦИИ № 3.—1925 г.

Издательство НАРКОМЗДРАВА
МОСКВА, М. Черкасский пер., № 2/6.

НОВОЕ (седьмое) ИЗДАНИЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ.

Особая Комиссия при Ученом Медицинском Совете НКЗ закончила свою работу, и Издательство НКЗ приступило к изданию новой Фармакопеи.

По соглашению с Наркомздравами Союзных Республик Фармакопея VII издания будет иметь характер обязательного руководства для всего Союза.

Новое издание Фармакопеи будет отпечатано на плотной бумаге и снабжено хорошим переплетом.

Выход в свет издания предполагается в августе месяце.

Цена будет установлена к выходу издания в свет.

Вследствие значительных материальных затрат как на составление Фармакопеи (вознаграждение особой комиссии), так и на ее издание (на бумагу, которая сильно повысилась в цене, типографские расходы и т. д.), мы вынуждены выпустить Фармакопею в ограниченном количестве экземпляров, ввиду чего об'являем

ОБ ОТКРЫТИИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПОДПИСКИ на VII издание Фармакопеи
НА НИЖЕСЛЕДУЮЩИХ УСЛОВИЯХ:

1) Подписка принимается до 1-го июля с. г.
2) Подписавшиеся не менее как на 10 экз. и выславшие задаток в сумме 50 руб. получат Фармакопею со скидкой 25% с номинальной цены.
3) Рассылка будет производиться в порядке очереди поступившей подписки.

ВЫШЛА И ПОСТУПИЛА В ПРОДАЖУ
СОКРАЩЕННАЯ АПТЕКАРСКАЯ ТАКСА и ТАХА LABORUM.
Такса издана на твердом бристольском картоне по типу сокращенных такс, издававшихся ранее Д. П. Урюпиным. Цена 1 руб.

ИМЕЮТСЯ НА СКЛАДЕ:
КОЛЛЕКЦИЯ АПТЕКАРСКИХ ЯРЛЫКОВ

Рисунок 2. Страница журнала «Фармацевтический Вестник» за 1925 г. с объявлением об открытии подписки на новое VII издание Фармакопеи СССР

Figure 2. Page of the journal "Pharmaceutical Bulletin" for 1925 with the announcement of the opening of a subscription to the new VII edition of the Pharmacopoeia of the USSR

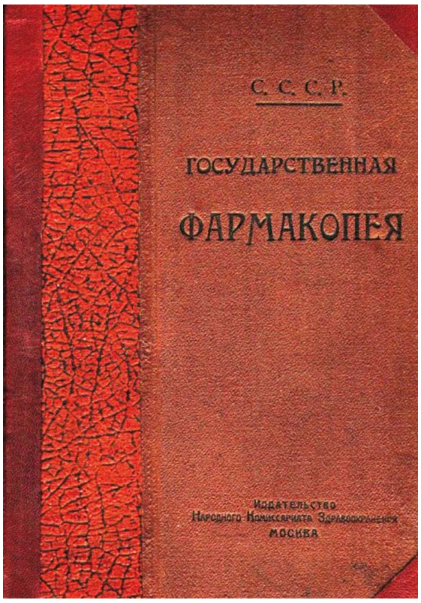


Рисунок 3. VII издание Фармакопеи СССР

Figure 3. VII edition of the Pharmacopoeia of the USSR

к выполнению в порядке чрезвычайной спешности и трудной работы по составлению новой Фармакопеи, которая в настоящее время в большинстве культурных стран выполняется длительным процессом работы постоянных комиссий, в состав которых входит ряд выдающихся специалистов» [20].

Комиссия обращает внимание на следующие моменты.

1. Фактическая работа над Фармакопеей началась в первые месяцы 1923 г. – через 5 лет после национализации всей отрасли.
2. Необходимые для работы Комиссии средства по смете, составленной Бюро, были отпущены уже 3 июня 1923 года.
3. Работа была завершена в кратчайший срок – менее чем за 2 года.
4. В составлении текста Фармакопеи принимали участие ведущие специалисты медицинской и фармацевтической областей.
5. Для разрешения сложных технических вопросов, не входящих в компетенции постоянных членов Комиссии, созывались особые заседания Бюро с привлечением соответствующих компетентных специалистов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из представленного видно, что, во-первых, руководство молодой республики осознавало важность мероприятий по разработке нового текста Фармакопеи и, во-вторых, благодаря тому, что в России в первой четверти XX в. уровень развития медицины вообще и фармации в частности находился на достаточно высоком уровне, это позволило быстро и качественно завершить запланированную работу. Для оперативного составления и редактирования проектов статей и приложений была организована Фармакопейная комиссия, в состав которой входили высокопрофессиональные отечественные специалисты. Сформированные подкомиссии (фармакологическая, химических препаратов, сложных фармацевтических и галеновых препаратов, препаратов растительного и животного происхождения, серотерапевтических препаратов, органотерапевтических препаратов) готовили проекты нормативных документов, рассылали их в адрес фармацевтических учреждений и компетентных специалистов для отзыва и критики. Полученные замечания обсуждались на пленарных заседаниях, целесообразные рекомендации принимались во внимание и учитывались при редактировании и окончательном составлении статей. Работа комиссии была завершена в срок, несмотря на сложное финансовое положение государства. История показала, что благодаря появлению VII издания Государственной фармакопеи СССР фармацевтическая отрасль Советского государства получила мощный толчок для своего развития.

VII Государственную фармакопею СССР ожидала непростая судьба. За 23 года ее существования она, единственная из всех фармакопей СССР, неоднократно переиздавалась. На время ее существования пришлись и индустриализация, идущая с ростом большого количества городов, и коллективизация, сопровождающаяся укрупнением деревень и образованием новых селений, и Великая Отечественная война с формированием огромного числа лечебных учреждений, где фармакопея должна быть по определению. После ее выхода она подвергалась суровой критике. Однако, несмотря на это, ее вклад в развитие отечественной фармацевтической отрасли невозможно переоценить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Салтыков Б. Н. К изданию новой VII Российской Государственной фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924;2(5):8–10.
2. Акопов А. И. Российские специальные журналы. 1917–1932 гг. Формирование типологической системы (Материалы к истории российской журналистики). Ростов-на-Дону: РГУ; 1994. 80 с.
3. Ипатьев В. Н. Жизнь одного химика. Воспоминания: Том 2. 1917–1930 гг. М.: ЁЁ Медиа; 2013. 648 с.
4. Зильберг И. Г. К Всесоюзной конференции по фармацевтическому образованию. *Химико-фармацевтический журнал*. 1923;2:2–3.
5. Обергард И. А. Новое международное фармакопейное соглашение. *Вестник фармации*. 1925;11:353–354.
6. Гарцштейн Л. Производственная работа ГОСМЕДПРОМТОРГА. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924;10–12(13–15):12–14.
7. Феррейн Ф. А. Состояние и перспективы фармацевтической промышленности. *Химико-фармацевтический журнал*. 1925;2(17):2–5.
8. Антоновцев В. Итоги объединения Госмедторга с Фарматрестом. *Химико-фармацевтический журнал*. 1925;3:8.
9. Отчеты Главного управления государственных химико-фармацевтических заводов и отделов и материалы к отчетам. Доклад коллегии Главного управления государственными химико-фармацевтическими заводами за 1918–1919 операционный год. РГАЭ. Фонд 8126. Опись 1. Дело 22. Лист 4–6. 11 октября 1919 – 30 мая 1920.
10. Отчет по научно-технической деятельности Главфармзава за 1920 г. РГАЭ. Фонд 8126. Опись 1. Дело 36. Лист 4–6. 1920.
11. Фармакопейная комиссия. *Всероссийский Фармацевтический Вестник*. 1923;3:15.
12. Попов Д. К вопросу о новом издании Российской фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924;2(5):12–14.
13. По поводу издания новой фармакопеи. *Всероссийский фармацевтический вестник*. 1923;1:10–11.
14. Обергард И. А. К новому (VII) изданию Российской Фармакопеи. *Всероссийский Фармацевтический Вестник*. 1923;3:9–10.
15. Салтыков Б. Н. К изданию новой VII Российской Государственной фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924; 3–4(6–7):13–16.
16. Салтыков Б. Н. К изданию новой VII Российской Государственной Фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924; 5–6(8–9):14–19.
17. Салтыков Б. Н. К изданию новой VII Российской Государственной фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1924; 10–12(13–15):3–7.
18. Салтыков Б. Н. К изданию новой фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1925;1(16):4–7.
19. Салтыков Б. Н. К изданию новой (VII) фармакопеи. *Химико-фармацевтический журнал*. 1925;2(17):21.
20. Государственная фармакопея СССР VII издания. М. 1925. 710 с.

REFERENCES

1. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy VII Rossiyskoy Gosudarstvennoy farmakopei* [To the publication of the new VII Russian State Pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;2(5):8–10. (In Russ.)
2. Akopov A. I. *Rossiyskie spetsial'nye zhurnaly. 1917–1932 gg. Formirovanie tipologicheskoy sistemy (Materialy k istorii rossiyskoy zhurnalistiki)* [Russian special magazines. 1917–1932. Formation of a typological system (Materials for the history of Russian journalism)]. Rostov-on-Don: RGU. 1994. 80 p. (In Russ.)
3. Ipatiev V. N. *Zhizn' odnogo khimika. Vospominaniya: Tom 2. 1917–1930 gg*. [The life of a chemist. Memoirs: Volume 2. 1917–1930]. Moscow: EE Media; 2013. 648 p. (In Russ.)
4. Zilberg I. G. *K Vsesoyuznoy konferentsii po farmatsevticheskomu obrazovaniyu* [For the All-Union Conference on Pharmaceutical Education]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1923;2:2–3. (In Russ.)
5. Obergard I. A. *Novoe mezhdunarodnoe farmakopeynoe soglashenie* [New international pharmacopoeial agreement]. *Vestnik farmatsii*. 1925;11:353–354. (In Russ.)
6. Garzshtein L. *Proizvodstvennaya rabota GOSMEDPROMTORGA* [Production work of GOSMEDPROMTORG]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;10–12(13–15):12–14. (In Russ.)
7. Ferrein F. A. *Sostoyanie i perspektivy farmatsevticheskoy promyshlennosti* [The state and prospects of the pharmaceutical industry]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1925;2(17):2–5. (In Russ.)
8. Antonovtsev V. *Itogi ob"edineniya Gosmedtorga s Farmatrestom* [Results of the merger of the Gosmedtorg with Farmatrest]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1925;3:8. (In Russ.)
9. *Otchety Glavnogo upravleniya gosudarstvennykh khimiko-farmatsevticheskikh zavodov i otdelov i materialy k otchetam. Doklad kollegii Glavnogo upravleniya gosudarstvennymi khimiko-farmatsevticheskimi zavodami za 1918–1919 operatsionnyy god. RGAE. Fond 8126. Opis' 1. Delo 22. List 4–6*. [Reports of the Main Directorate of State Chemical and Pharmaceutical Plants and Departments and materials for reports. Report of the Board of the Main Directorate of State Chemical and Pharmaceutical Plants for the 1918-1919 operational year. RGAE. Fund 8126. Inventory 1. Case 22. Sheet 4–6]. October 11, 1919 – May 30, 1920. (In Russ.)
10. *Otchet po nauchno-tekhnicheskoy deyatel'nosti Glavfarmzava za 1920 g. RGAE. Fond 8126. Opis' 1. Delo 36. List 4–6*. [Report on scientific and technical activities of Glavfarmzava for 1920 RGAE. Fund 8126. Inventory 1. Case 36. Sheet 4–6]. 1920. (In Russ.)
11. *Farmakopeynaya komissiya* [Pharmacopoeial Commission]. *Vserossiyskiy Farmatsevticheskiy Vestnik*. 1923;3:15. (In Russ.)
12. Popov D. *K voprosu o novom izdanii Rossiyskoy farmakopei* [On the issue of a new edition of the Russian Pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;2(5):12–14. (In Russ.)
13. *Po povodu izdaniya novoy farmakopei* [Regarding the publication of a new pharmacopoeia]. *Vserossiyskiy farmatsevticheskiy vestnik*. 1923;1:10–11. (In Russ.)
14. Obergard I. A. *K novomu (VII) izdaniyu Rossiyskoy Farmakopei* [To the new (VII) edition of the Russian Pharmacopoeia]. *Vserossiyskiy Farmatsevticheskiy Vestnik*. 1923;3:9–10. (In Russ.)
15. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy VII Rossiyskoy Gosudarstvennoy farmakopei* [To the publication of the new VII Russian State Pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;3–4(6–7):13–16. (In Russ.)
16. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy VII Rossiyskoy Gosudarstvennoy Farmakopei* [To the publication of the new VII Russian State Pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;5–6(8–9):14–19. (In Russ.)
17. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy VII Rossiyskoy Gosudarstvennoy farmakopei* [To the publication of the new VII Russian State Pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1924;10–12(13–15):3–7. (In Russ.)
18. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy farmakopei* [To the publication of a new pharmacopoeia]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1925;1(16):4–7. (In Russ.)
19. Saltykov B. N. *K izdaniyu novoy (VII) farmakopei* [To the publication of a new (VII) pharmacopoeia. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1925;2(17):21. (In Russ.)
20. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR VII izdaniya* [State Pharmacopoeia of the USSR VII edition]. Moscow. 1925. 710 p. (In Russ.)

СИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

МЕЖДУНАРОДНАЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ — ТРАДИЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Г. ТОМСК 13—16 СЕНТЯБРЯ 2021 ГОДА

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146
УДК 543.544; 615.074

Обзорная статья / Review article

Трансфер методик определения примесей: сравнительное испытание, валидация, критерии приемлемости (обзор)

Н. А. Эпштейн*

Департамент регистрации и разработки лекарственных средств ООО «ИРВИН 2», 115446, Россия, г. Москва, Коломенский проезд, д. 13А

***Контактное лицо:** Эпштейн Наум Аронович. **E-mail:** naumepshtein@gmail.com

ORCID: Н. А. Эпштейн – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Статья поступила: 11.12.2020 **Статья принята в печать:** 15.03.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. При трансфере методик определения примесей используют различные подходы. В большинстве случаев проводят сравнительное испытание образцов или частичную валидацию методик. При этом до сих пор остается актуальным ряд важных для практики вопросов.

Текст. Рассмотрены особенности валидации методик и сравнительного испытания образцов при трансфере методик определения примесей. Приведены потенциальные критерии приемлемости – требования к допустимому различию результатов передающей и принимающей лабораторий. Рассмотрены расчетные формулы теста TOST и приведено критическое условие для сравнительного испытания образцов. Обсуждены ключевые моменты, которые следует учитывать при трансфере методик.

Заключение. Представлены данные и рекомендации, которые важны для повышения надежности трансфера методик определения примесей.

Ключевые слова: трансфер методик, примеси, критерии приемлемости, сравнительное испытание образцов, валидация

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Автор участвовал в сборе информации, ее анализе и в написании текста статьи.

Для цитирования: Эпштейн Н. А. Трансфер методик определения примесей: сравнительное испытание, валидация, критерии приемлемости. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):137–146. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146

Transfer of Impurities Determination Methods: Comparative Testing, Validation, Acceptance Criteria (Review)

Naum A. Epshtein*

Department of registration and development of medicines LLC «IRWIN 2», 13A, Kolomensky proezd, Moscow, 115446, Russia

***Corresponding author:** Naum A. Epshtein. **E-mail:** naumepshtein@gmail.com

ORCID: Naum A. Epshtein – https://orcid.org/0000-0001-8047-4078.

Received: 11.12.2020 **Revised:** 15.03.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. Different approaches are used for transfer of impurities determination methods. In most cases, comparative testing of samples or partial validation of methods is performed. At the same time, a number of issues important for practice are still relevant.

Text. The features of methods validation and comparative testing of samples during the transfer of impurities determination methods are considered. Potential acceptance criteria – requirements to the permissible difference between results of transmitting and receiving laboratories – are given. The calculation formulas of the TOST test are considered, and the critical condition for the comparative testing of samples is given. The key points that should be taken into account when transferring the methods are discussed.

Conclusion. The data and recommendations are presented, which are important for increasing the reliability of the transfer of the impurities determination methods.

Keywords: methods transfer, impurities, acceptance criteria, comparative testing of samples, validation

Conflict of interest. The author declares that he has no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

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

For citation: Epshtein N. A. Transfer of impurities determination methods: comparative testing, validation, acceptance criteria. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):137–146. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-137-146

ВВЕДЕНИЕ

Трансфер (передача) аналитических методик – документированная процедура, которая предоставляет полномочия лаборатории принимающей стороны использовать аналитические методики, разработанные в лаборатории передающей стороны [1]. К настоящему времени опубликованы десятки руководств и обзоров по трансферу аналитических методик. В них, как правило, рассматриваются регуляторные и организационные вопросы трансфера аналитических методик, например [1, 2][1]. В то же время для методик количественного определения примесей до сих пор остаются актуальными вопросы, связанные с выбором способа трансфера методик и критериями приемлемости – требованиями к допустимому различию результатов передающей и принимающей сторон.

Целью статьи является рассмотрение особенностей валидации методик и сравнительного испытания образцов при трансфере методик определения примесей; обсуждение критериев приемлемости и ключевых моментов, способных повлиять на результаты трансфера.

В Фармакопее США в разделе <1224> Transfer of analytical procedures указаны следующие способы трансфера аналитических методик [4].

1. *Comparative Testing* – сравнительное испытание образцов одних и тех же серий лекарственного средства (лекарственного препарата, фармацевтической субстанции) или модельных образцов (для гарантированной однородности анализируемых объектов) в передающей и принимающей лабораториях.
2. *Covalidation* – совместное проведение валидации методик передающей и принимающей лабораториями. При совместной валидации передающая сторона привлекает сотрудников принимающей стороны для проведения валидации на своей территории [1].
3. *Partial revalidation* – частичная валидация методики (верификация валидационных характеристик) в принимающей лаборатории.
4. *Revalidation* – полная валидация (ревалидация) методики в принимающей лаборатории.

Альтернативой способам 1–4 является *Transfer Waiver* – решение не проводить трансфер аналитической методики и ограничиться ее верификацией [4]. Условия для этого и возможные действия изложены в специальном разделе фармакопеи США <1226> Verification of compendial procedures [4]. Отметим несколько важных моментов. Верификация без частичной валидации методики годится только для фармакопейных методик контроля качества фармацевтических субстанций. Причина – возможное влияние различия вспомогательных веществ в случае лекарственных препаратов. Для методик определения примесей передаваемая методика должна соответствовать фармакопейной методике не только по пробоподготовке и условиям хроматографирования, но и по конкретной хроматографической колонке, которая указана в передаваемой методике[2]. Следует с осторожностью относиться к «допустимым коррекциям» (permissible adjustments) условий хроматографирования, которые приведены в Фармакопее США (USP), Европейской фармакопее (EP) и ГФ XIV [4–6]. Оказалось, что некоторые из этих коррекций неприменимы для методик определения примесей. Эта проблема и пути ее решения подробно рассмотрены в [7].

При трансфере методик количественного определения примесей (далее – методик определения примесей) в большинстве случаев используют способ 1, так как он является наиболее простым и интуитивно понятным. Реже используют способ 3. Способы 2 и 4 применяют редко из-за больших затрат времени и средств. При любом способе трансфера методики в первую очередь проверяют выполнение требований пригодности хроматографической системы. Только затем в случае положительного результата проводят работы по сравнительному испытанию образцов или по частичной или полной валидации методики.

Частичная валидация (верификация валидационных характеристик) при трансфере методик

Полная валидация методики в принимающей лаборатории может потребоваться только в крайнем случае. Как правило, достаточна частичная валидация методики, то есть верификация определенных валидационных характеристик. Мы рекомендуем верифицировать специфичность, прецизионность, предел количественного определения LOQ.

- ***Верификация специфичности методики***. При верификации специфичности методики в принимающей лаборатории часто ограничиваются проверкой выполнения требований пригодности системы, а также тестированием разделения идентифицированных примесей. Однако это не всегда достаточно для выявления рисков, связанных с недостаточной разделяющей способностью передаваемой методики. Рекомендуем внимательно посмотреть результаты стрессовых исследований в валидационной документации передающей лаборатории. Прежде всего разложение лекарственного вещества при стрессах должно быть не очень маленьким – не меньше нор-

[1] Вопросы трансфера биоаналитических методик подробно рассмотрены в обзоре [3].

[2] Колонки для фармакопейных статей Европейской фармакопеи можно найти в Knowledge Database: https://extranet.edqm.eu/publications/recherches_sw.shtml, а для Фармакопеи США в базе данных: http://www.usp.org/resources/chromatographic-columns.

мируемой суммы примесей, и не слишком большим (из-за протекания вторичных процессов, не свойственных условиям хранения лекарственного средства); рекомендации по верхней границе разложения приведены в [8, 9]. Представленные хроматограммы и таблицы обсчета пиков должны однозначно подтверждать достаточное (приемлемое) разделение пиков примесей между собой и с другими пиками. *Для подтверждения приемлемости разделения частично перекрывающегося пика примеси* можно использовать требование к отношению «пик – долина» (peak-to-valley): $p/\nu \geq 1{,}5$ [10] *или условие*: относительное стандартное отклонение RSD площади частично перекрывающегося пика примеси не должно превышать 20 % (наибольшее допустимое значение RSD при вычислении LOQ [11, p. 24]). Если результаты стрессовых исследований отсутствуют или вызывают сомнение, то может встать вопрос о проведении стрессовых исследований при верификации специфичности методики [8, 12]. Однако это крайний вариант. В качестве альтернативы можно использовать анализ образцов нескольких серий лекарственного средства в конце срока годности. На хроматограммах испытуемых растворов этих образцов должны быть достаточно хорошо разделены пики примесей между собой, а также с пиками лекарственного вещества, системными пиками и пиками плацебо; результаты определения примесей должны соответствовать нормируемым пределам в спецификации. Для повышения надежности выводов при верификации специфичности методики можно контролировать спектральную чистоту пика лекарственного вещества на хроматограммах испытуемых растворов.

- ***Верификация прецизионности методики***. При верификации прецизионности методик определения примесей обычно рассматривают повторяемость (сходимость). Типичным критерием приемлемости для повторяемости является требование: относительное стандартное отклонение результатов определения содержания примесей RSD ≤ 5,0 %. Иногда верифицируют промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность. Требования к внутрилабораторной прецизионности методик рассмотрены в [13, 14].
- ***Верификацию значения LOQ*** проводят для проверки необходимой чувствительности определения примесей. Обычно верифицируют значение LOQ для идентифицированных примесей, содержание которых определяется с использованием стандарта примеси. Для неидентифицированных примесей и для идентифицированных примесей, которые определяются относительно стандарта основного вещества, необходимая чувствительность методики контролируется на первом этапе трансфера методики – при проверке пригодности системы. Проверяют выполнение требования: отношение сигнал/шум базовой линии для пика основного (лекарственного) вещества S/N ≥ 10 при хроматографировании раствора для проверки чувствительности системы. Обычно этого достаточно. В то же время для идентифицированных примесей, которые определяются относительно стандарта основного вещества, желательно верифицировать значение поправочного коэффициента F. Способы корректного определения поправочных коэффициентов подробно рассмотрены в [15].

При частичной валидации методики обычно используют такие же критерии приемлемости, что и в валидационной документации передающей стороны. Иногда принимающая сторона может настаивать на иных критериях приемлемости. Например, на более надежном определении LOQ по отношению сигнал/шум базовой линии S/N = 10, а не по калибровочному графику. Это обосновывается тем, что именно принимающая сторона будет ответственна за результаты анализов продукции. Типичные критерии приемлемости для валидации аналитических методик приведены в ряде обзоров и книг; рекомендуем следующие [14, 16, 17].

Примечание. На практике имеет место различие в трансфере методик в РФ и за рубежом. В РФ при трансфере методик чаще всего принимающая сторона является арбитром при оценке пригодности передаваемой методики для контроля качества продукции. За рубежом, наоборот, обычно передающая лаборатория является арбитром. Она проверяет готовность принимающей лаборатории правильно воспроизводить методику и получать результаты, укладывающиеся в критерии приемлемости, разработанные передающей лабораторией. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Сравнительное испытание образцов при трансфере методик

Как отмечено выше, этот способ трансфера методик является наиболее распространенным. Тем не менее анализ литературы по трансферу аналитических методик показал, что имеется лишь небольшое количество публикаций, в которых указаны требования к допустимому различию результатов анализов для методик определения примесей [14, 18–22]. Они систематизированы в таблице. Из нее видно, что до сих пор не узаконены единые требования к допустимому различию результатов передающей и принимающей лабораторий. В связи с этим приведенные в таблице 1 критерии приемлемости следует рассматривать как ориентиры при трансфере методик определения примесей. При трансфере методик ис=пользуются два вида критериев приемлемости (acceptance criteria). Первый – это эмпирические критерии приемлемости, второй – статистические критерии приемлемости. Для методик определения примесей характерно, что статистические критерии приемлемости используются не отдельно, а в совокупности с эмпирическими критериями приемлемости; причина будет рассмотрена ниже.

При сравнительном испытании образцов сравнивают результаты определения всех нормируемых показателей для примесей в спецификации. Обычно сравнивают содержание наибольшей неидентифицированной примеси, содержание отдельно нормируемых (идентифицированных) примесей и сумму примесей.

Таблица 1. Критерии приемлемости для сравнительного испытания образцов при трансфере методик определения примесей

Table 1. Acceptance criteria for comparative testing of samples for transfer methods for determination of impurities

№	**Эмпирические критерии приемлемости*** **Empirical acceptance criteria**
1	Разница между средними результатами определения содержания примесей (выше LOQ) между принимающей и передающей лабораториями для каждого образца не должна превышать: **±50 %** (относительных) для примесей < 0,1 %; **±40 %** (относительных) для примесей ≥ 0,1 % и < 0,5 %; **±20 %** (относительных) для примесей ≥ 0,5 % [18, p. 301] The difference between the average results of determining the content of impurities (above LOQ) between the receiving and transmitting laboratories for each sample should not exceed: **±50 %** (relative) for impurities < 0.1 %; **±40 %** (relative) for impurities ≥ 0.1 % and < 0.5 %; **±20 %** (relative) for impurities ≥ 0.5 % [18, p. 301]
2	Для примесей < 0,15 % отклонения от данных передающей стороны (ПС) должны быть в пределах **0,04 %** (абсолютное значение). Для примесей ≥ 0,15 % отклонения от данных ПС должны быть в пределах **30 %** (относительное значение). Для суммы примесей < 2,0 % отклонения от данных ПС должны быть в пределах **0,3 %** (абсолютное значение). Для суммы примесей ≥ 2,0 % отклонения от данных ПС должны быть в пределах **0,5 %** (абсолютное значение). Пример из [19, приложение 6] For impurities < 0.15 %, the deviation from the data of the transmitting unit (TU) should be within **0.04 %** (absolute value). For impurities ≥ 0.15 %, the deviation from the TU data should be within **30 %** (relative value). For the sum of impurities < 2.0 %, the deviations from the TU data should be within **0.3 %** (absolute value). For the sum of impurities ≥ 2.0 %, the deviations from the TU data should be within **0.5 %** (absolute value). An example from [19, Appendix 6]
	Статистические + эмпирические критерии приемлемости* **Statistical + empirical acceptance criteria ***
3	*Рекомендации Международного общества для фармацевтического инжиниринга (ISPE)* *Для умеренно высоких уровней* содержания примесей <используют> два односторонних *t*-теста; разница между площадками <должна быть> **≤10%** при 95%-й доверительной вероятности. *Для низких уровней* содержания примесей, но выше порога игнорирования, разница средних значений передающей и принимающей сторон должна находиться в пределах ±25 % относительных или **±0,05 %** абсолютных [20] *International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE) recommendations* *For moderately high levels* of impurities, <use> two one-sided *t*-tests; the difference between sites <should be> **≤10 %** at a 95 % confidence level. *For low levels* of impurities, but above the desregard limit, the difference between the average values of the transmitting and receiving unuts should be within ±25 % relative or **±0.05 %** absolute [20]
4	*Для высоких уровней* содержания примесей: два односторонних *t*-теста; разница между площадками **≤10 %** при 95%-й доверительной вероятности. *Для низких уровней* содержания примесей разница средних значений передающей и принимающей сторон должна быть в пределах **±25 %** (относительных) [18, p. 300] For high levels of impurities: two one-sided *t*-tests; difference between unites **≤10 %** at 95 % confidence level. For low levels of impurities, the difference between the average values of the transmitting and receiving units should be within **±25 %** (relative) [18, p. 300]
5	*Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ)* *Для умеренно высоких уровней* содержания примесей <используют> два односторонних *t*-теста; разница <должна быть> **≤10 %** для 95%-й доверительной вероятности. *Для низких уровней* содержания примесей значения на площадке принимающей стороны должны находиться в пределах **±25 %** от значений на площадке передающей стороны, или среднее значение площадки принимающей стороны должно находиться в пределах **±0,05 %** от среднего значения на площадке передающей стороны [14, 21, 22] *World Health Organization (WHO)* *For moderately high levels* of impurities, <use> two one-sided *t*-tests; the difference <should be> **≤10 %** for a 95 % confidence level. *For low levels* of impurities, the values of the receiving unit should be within ±25 % of the values of the transmitting unit, or the average value of the receiving unit should be within **±0.05 %** of the average value of the transmitting unit [14, 21, 22]

Примечание. * Относительная разница значений передающей и принимающей лабораторий обычно вычисляется относительно передающей лаборатории.

Note. * The relative difference between the transmitting and receiving laboratories is usually calculated relative to the transmitting laboratory.

- ***Эмпирические критерии приемлемости*** основаны на практических знаниях, полученных при трансфере методик определения примесей. Они указываются в виде допустимой разницы результатов анализов передающей и принимающей сторон в относительных и/или абсолютных %. Достоинством эмпирических критериев приемлемости является их применимость при низком содержании примесей. В то же время существенным недостатком эмпирических критериев приемлемости является большая субъективность. Это подтверждается большим различием этих критериев в таблице.

Для сравнительного испытания образцов при трансфере методик определения примесей актуальным является вопрос: *надо ли при трансфере методик учитывать примеси с содержанием ниже порога игнорирования*? Ответ на него был получен на практике. Автору известен случай, когда средний результат определения наибольшей неидентифицированной примеси у передающей стороны был 0,05 %, а у принимающей стороны 0,03 %. С практической точки зрения такая разница результатов является незначительной, приемлемой. Однако она составила ≈40 % по отношению к передающей стороне. На основании этого случая был согласован скорректированный критерий приемлемости при содержании примесей менее 0,1 %: 50 % вместо 25 % относительных. Заметим, что в случае игнорирования примесей с содержанием меньше 0,05 % эта разница составила бы 100 % относительных! Таким образом, *при трансфере методик определения примесей* целесообразно учитывать все примеси (обычно это примеси ≥0,01 %) независимо от наличия порога игнорирования в методике. Это снижает риск отрицательного результата трансфера в случае практически незначимого различия результатов определения примесей.

- ***Статистические критерии приемлемости*** основаны на оценке статистической эквивалентности результатов, получаемых в разных лабораториях. Для этого могут быть использованы различные подходы. Однако для трансфера методик наиболее подходит TOST (Two One-Sided Test), в котором используются два односторонних t-теста [14, 22–28].

TOST существенно отличается от привычного классического *t*-теста Стьюдента (Two-sample t-test). Казалось бы, почему не использовать последний, так как он предназначен для оценки статистической незначимости различия средних значений при заданной вероятности. Однако на практике оказалось, что классический *t*-тест Стьюдента не годится для трансфера методик. Он часто может приводить к ложноотрицательному выводу о неэквивалентности результатов анализов при трансфере методик [23, 27, 28]. В общем случае тест TOST оценивает при заданной вероятности не статистическую незначимость различия средних значений, а попадание разности или относительной разности средних значений с доверительным интервалом в допустимый диапазон [14, 24, 28]. То есть допускается определенная практическая незначимость различия средних значений (эквивалентность), несмотря на статистическую значимость этого различия.

В таблице 1 приведен критерий приемлемости при использовании TOST для методик определения примесей из руководств Всемирной некоммерческой добровольной организации технических специалистов (ISPE) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ):

- *Для умеренно высоких уровней* содержания примесей <используют> два односторонних *t*-теста; разница между площадками должна быть ≤10 % при 95%-й доверительной вероятности [20, 21].

Для понимания сути этого критерия и необходимых вычислений приведем типичные формулы, которые используются для теста эквивалентности TOST при трансфере методик [24]:

$$C_L = 100\left[\left(\frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2}\right)\cdot e^{-(t_{\alpha,(2n-2)}\cdot\hat{\sigma})} - 1\right], \quad (1)$$

$$C_U = 100\left[\left(\frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2}\right)\cdot e^{(t_{\alpha,(2n-2)}\cdot\hat{\sigma})} - 1\right], \quad (2)$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{1}{2n}(\hat{\sigma}_1^2 + \hat{\sigma}_2^2)\cdot\left(\frac{1}{\bar{x}_1^2} + \frac{1}{\bar{x}_2^2}\right)}, \quad (3)$$

где C_L и C_U – нижний и верхний пределы (в %) доверительного интервала теста TOST; $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ – средние значения результатов анализов; $t_{\alpha,(2n-2)}$ – значение одностороннего *t*-критерия Стьюдента для вероятности ошибки $\alpha = 0{,}05$ (доверительная вероятность $P = 1 - \alpha = 0{,}95$, т. е. 95 %); n – количество результатов анализов в каждой из лабораторий при трансфере методики; $\hat{\sigma}_1$ и $\hat{\sigma}_2$ – стандартные отклонения средних значений результатов анализов; индексы 1 и 2 относятся к лабораториям 1 и 2 соответственно. Обозначим предельное значение допустимой разницы между площадками (в данном случае 10 %) как $\boldsymbol{L_{\%}}$. Тогда ***трансфер методики считается приемлемым (результаты анализов эквивалентны), если значения C_L и C_U находятся в интервале от $-L_{\%}$ до $+L_{\%}$*** (от –10 % до +10 % для указанного выше критерия приемлемости):

$$-L_{\%} \le C_L \text{ и } C_U \le +L_{\%}. \quad (4)$$

$$-10 \le C_L \text{ и } C_U \le +10. \quad (5)$$

Из формул (1)–(3) видно, что нижний и верхний пределы доверительного интервала теста TOST – C_L и C_U зависят от количества анализов *n*, средних результатов анализа $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ и стандартных отклонений средних значений результатов анализов от $\hat{\sigma}_1$ и $\hat{\sigma}_2$. Рассмотрим влияние этих факторов. Прежде всего отметим, что при тесте TOST типичное (минимальное) количество анализов, выполняемых каждым химиком, $n = 6$ [27, 28]. В то же время может потребоваться большее количество анализов для получения более надежных выводов [24, 27]. Наши модельные расчеты показали, что при уменьшении $\hat{\sigma}$ и постоянных значениях n, $\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$ уменьшается разница между C_L и C_U. В предельном случае при $\hat{\sigma} \to 0$ (то есть при незначимости случайных ошибок) экспоненциальный множитель в формулах (1) и (2) становится равным 1. Это приводит к упрощению условия (4) для положительного результата трансфера методики:

$$-L_{\%} \le C_L = C_U = 100\left[\left(\frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2}\right) - 1\right] \le +L_{\%}. \quad (6)$$

Удалим из (6) C_L и C_U, затем разделим все части неравенства на 100 и перенесем 1 в левую и в правую части неравенства; в результате получим *критическое условие для отношения средних значений результатов анализов $\bar{x}_1/\bar{x}_2$ в принимающей и передающей лабораториях*:

$$-L+1 \le \frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2} \le L+1, \qquad (7)$$

где *L* – предельное значение «допустимой разницы между площадками» (лабораториями), выраженное в долях от единицы (в нашем случае $L = 10(\%)/100 = 0{,}1$).

При трансфере методик вклад случайных ошибок в результаты анализов всегда существенен. Поэтому *для положительного результата трансфера методики при использовании TOST необходимо*, чтобы отношение средних результатов анализа $\bar{x}_1/\bar{x}_2$ было не только внутри интервала $L \pm 1$ в соответствии с (7) – в нашем случае от 0,9 до 1,1, но и находилось в достаточной дали от границ этого интервала. Например, $0{,}95 \le \bar{x}_1/\bar{x}_2 \le 1{,}05$.

Важные особенности проведения теста TOST для трансфера методик рассмотрены в [27, 28]. В частности, рекомендуется предварительно оценивать ожидаемые результаты TOST на основании данных, полученных (двумя химиками) при тестировании внутрилабораторной прецизионности в передающей лаборатории при валидации методики [28]. При использовании TOST для оценки эквивалентности результатов в лабораториях можно использовать обоснованное значение максимально допустимого различия между средними $\Delta_{\bar{x}_{\max, 95\%}}$ (accuracy acceptance limit) [28] вместо априорного допустимого различия в 10 %. С этой целью предложены специальные формулы. Рассмотрены другие статистические подходы для оценки эквивалентности результатов анализов и в том числе для методик определения примесей [14]. Однако все они, за исключением TOST, так и не нашли значимого применения при трансфере аналитических методик.

Ключевые моменты, которые следует учитывать при трансфере методик определения примесей

- *Хроматографическая колонка.* На практике передающая сторона обычно предоставляет хроматографическую колонку принимающей стороне. Однако при разработке методики иногда может происходить модификация хроматографической колонки и изменение ее селективности. Поэтому для принимающей стороны лучше проводить анализы на новой (ранее не использовавшейся) хроматографической колонке, указанной в передаваемой методике.
- *Содержание примесей в передаваемых образцах.* Опыт трансфера методик показал, что риск отрицательного результата можно значительно уменьшить путем увеличения содержания наибольшей неидентифицированной примеси до значения, которое существенно превышает порог игнорирования примесей, но не больше ее нормируемого предела. С этой целью образцы лекарственного средства можно попытаться искусственно состарить. Например, путем их нагревания в термостате или климатической камере (исключением являются суппозитории и мягкие лекарственные формы). В образцы, при необходимости, можно добавлять идентифицированные примеси; условием является сохранение однородности образцов по содержанию примесей. Это можно легко делать в случае жидких лекарственных форм. Отметим также, что в некоторых фирмах при трансфере методик допускается использовать образцы OOS (Out-of-specification), то есть те, в которых содержание примесей превышает пределы, указанные в спецификации.

Подчеркнем, что некорректной является ситуация, когда в образцах, передаваемых для трансфера методики, содержание нормируемых примесей меньше порога игнорирования примесей и при этом такие примеси не учитываются. Это же относится и к образцам лекарственного средства, которые анализируют при тестировании прецизионности методики в рамках ее валидации. Автору статьи несколько раз встречались такие ситуации при экспертизе валидационной документации и протоколов трансфера методик. Это важный момент, на который следует обратить внимание как передающей, так и принимающей сторонам.

- *Профили примесей на хроматограммах испытуемых растворов образцов в передающей и принимающей лабораториях.* Руководство ISPE рекомендует сопоставлять профили примесей при трансфере методик определения примесей [20]. Это важно не только для надежности передачи методики из одной лаборатории в другую. Сравнение профилей примесей может быть использовано для поиска причин негативного результата трансфера методики. С этой целью, при необходимости, привлекают результаты стрессовых исследований и тестирования стабильности лекарственного средства, проводят очистку колонки и т. п. Важно установить и устранить причину «лишних» или «недостающих» пиков и получить сходные профили примесей в передающей и принимающей лабораториях.
- *Различие в чувствительности детекторов и повышенный шум базовой линии у принимающей стороны.* Эти факторы могут сильно влиять прежде всего на результат проверки чувствительности хроматографической системы в принимающей лаборатории [29]. Следует обращать внимание на тип детектора, указанного в методике. Например, если в методике указано «УФ-детектор», то лучше не использовать диодноматричный детектор (DAD), так как у него может оказаться недостаточная чувствительность. Для передающей лаборатории желательно, чтобы методика обеспечивала отношение сигнал/шум базовой линии S/N не меньше 15–20 при хроматографировании раствора для проверки чувствительности системы. Это минимизирует риск недостаточной чувствитель-

ности системы в принимающей лаборатории. В связи с этим также необходимо, чтобы принимающая сторона обеспечила приемлемый шум базовой линии.

- *Условия транспортировки и хранения образцов.* На условия транспортировки, а также на правильное хранение передаваемых образцов следует обращать особе внимание. Автору известен случай, когда при транспортировке образца препарата около 2 часов в зимнее время в отапливаемом салоне легкового автомобиля в образце существенно увеличилось содержание примесей. Это было подтверждено при повторном анализе возвращенного образца в передающей лаборатории.
- *Качество воды, растворителей, реагентов, стандартных образцов, солей.* Этот фактор может оказаться решающим особенно для градиентных методик определения примесей. Обращаем внимание на то, что в фармакопейных статьях с хроматографическими методиками термин «вода» означает специально очищенную воду для хроматографии. Использование воды качества «вода очищенная» и «вода дистиллированная», а также растворителей, не предназначенных для хроматографии, может приводить к регистрации пиков примесей, не свойственных анализируемому образцу. Качество растворителей, стандартных образцов и реагентов должно соответствовать требованиям, указанным в передаваемой методике. Это же относится и к солям. Ошибка может быть вызвана взятием безводных солей вместо гидратов или, наоборот, гидратов вместо безводных солей. Для некоторых методик может оказаться критичным взятие ион-парных реагентов алкилсульфатов вместо алкилсульфонатов и т. д.
- *Влияние продолжительной дегазации подвижной фазы во время ее фильтрации или обработки ультразвуком.* Этот фактор может негативно сказаться на результатах трансфера, если подвижная фаза содержит небольшое количество летучего компонента, например ацетонитрила. В таких случаях по нашему опыту рекомендуем ограничиться дегазацией подвижной фазы с помощью дегазаторов, встроенных в хроматограф. В противном случае из-за частичного улетучивания растворителя может наблюдаться изменение времени удерживания хроматографических пиков и потеря специфичности методики.
- *Использование автоматического смешивания элюентов в хроматографе вместо ручного приготовления подвижной фазы и наоборот.* Этот фактор может приводить к различию соотношения органического компонента подвижной фазы и воды на несколько процентов [30]. Это может вызывать существенное изменение времени удерживания хроматографических пиков. Поэтому при трансфере методик следует использовать именно тот способ получения подвижной фазы, который указан в передаваемой методике.
- *Температура окружающей среды.* Известно влияние температуры хроматографической колонки, а также температуры термолабильных образцов на результаты определения примесей [30, 31]. В то же время не всегда обращают внимание на температуру помещения, в котором находятся хроматографы. Она должна быть ниже на несколько градусов, чем температура термостата с колонкой, если в термостате не предусмотрено охлаждение колонок.
- *Существенное различие в объеме задержки Dwell Volume при градиентном элюировании.* Этот фактор может приводить к разным временам удерживания хроматографических пиков, к изменению формы и даже к перекрыванию некоторых пиков [32]. В связи с этим в случае градиентного элюирования следует определять Dwell Volume [18, p. 86] и при необходимости пересчитывать время в программе градиента по определенной формуле. Если в передаваемой методике приведено значение объема задержки, то временные точки t_c (мин), указанные в программе градиента, пересчитывают по формуле:

$$t_c = t \cdot \frac{D - D_0}{F}, \tag{8}$$

где D – объем задержки, мл; D_0 – объем задержки, указанный в передаваемой методике, мл; F – скорость подвижной фазы, мл/мин [5].

- *Разогревание раствора при обработке ультразвуком.* Этот фактор может служить причиной значительного расхождения результатов определения примесей в передающей и принимающей лабораториях. Поэтому при обработке ультразвуком растворов испытуемых и стандартных образцов необходимо охлаждать воду в ультразвуковой ванне. Для этой цели лучше всего использовать циркуляционный термостат с задаваемой температурой охлаждающей воды.
- *Сорбция определяемых веществ на фильтре, стеклянных и других поверхностях.* Для минимизации риска негативного влияния этого фактора в принимающей лаборатории должны использоваться только такие фильтры и посуда, которые указаны в передаваемой методике. В случае биологических молекул могут потребоваться капиллярные трубки и узлы хроматографа из материала типа PEEK (polyether ether ketone). Вопросы, связанные сорбцией лекарственных веществ на стекле и пластике, рассмотрены в [33–35].

На практике при трансфере методик потенциально возможно негативное влияние и других факторов. Для их поиска, в случае необходимости, можно воспользоваться рекомендациями из [18, 29–31, 36–38], а также в интернете по ключевому слову Troubleshooting (поиск неисправностей).

- *При трансфере методики определения примесей для препарата с несколькими дозировками, анализируемыми по одной и той же методике, выбирается наименьшая дозировка.* Такой подход нередко используется в фирмах. Однако он может быть связан с риском для принимающей стороны. В связи с этим следует убедиться, что на хроматограммах раствора плацебо у более высоких дозировок отсутствуют дополнительные пики по сравнению с наименьшей дозировкой.

Что предпочтительнее при трансфере методики: сравнительное испытание образцов или валидация методики?

На этот вопрос нет однозначного ответа. С теоретической точки зрения определенное преимущество имеют частичная и полная валидация методики. Дело в том, что результаты сравнительного испытания образцов могут зависеть от свойств передаваемых образцов и содержания в них примесей (как отмечено выше), а не только от самой методики. Дополнительным преимуществом валидации методик при трансфере является возможность использования общепринятых критериев приемлемости. Кроме того, при валидации передаваемой методики проверяют и иногда уточняют значения поправочных коэффициентов (F) для идентифицированных примесей. Автору известен случай, когда в методике передаваемой от зарубежной фирмы в числителе расчетной формулы для определения примесей вместо поправочного коэффициента F ошибочно использовали значение коэффициента относительной чувствительности RRF = 1/F.

С другой стороны, сравнительное испытание образцов имеет важное преимущество. Оно является более простым тестированием передаваемой методики и дает возможность «проверить понятность изложения методики для рядового исполнителя», а также определить «узкие» места методики (их надо учитывать при рутинных анализах). При этом результат сравнительного испытания может оказаться важным не только для принимающей, но и для передающей стороны. При необходимости передающая сторона имеет возможность уточнить методику. Из-за этого, а также по причине простоты и наглядности сравнительное испытание образцов значительно более распространено, чем валидация передаваемой методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше данные и рекомендации важны для повышения надежности трансфера методик определения примесей. Они могут быть использованы для обоснования выбора способа трансфера методик, критериев приемлемости и оценки результатов трансфера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Старчак Ю. А., Гаврилин М. В., Шинева Н. В. Трансфер аналитических методик. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):182–187. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187.
2. Riley C. M., Rosanske T. W., Reid G. L. Analytical method transfer. In: Specification of Drug Substances and Products. Development and Validation of Analytical Methods. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 125–148.
3. Briggs R. J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K. S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P. A. R., Duchene P., Hu P., Abbott R. W. Method Transfer, Partial Validation, and Cross Validation: Recommendations for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *The AAPS J.* 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. United States Pharmacopoeia. USP41–NF36. 2018.
5. European Pharmacopoeia, 9.5th ed. Chapter 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques. EDQM, Strasbourg. 2018.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т. 1. М.: Министерство здравоохранения РФ; 2018. С. 867–871.
7. Epshtein N. A. Revalidation of Procedures and Allowed Adjustments to Chromatography Conditions in Liquid Chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;53(12):1174–1183. DOI: 10.1007/s11094-020-02143-9.
8. Эпштейн Н. А. О стрессовых экспериментах при разработке/усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016;3:118–132.
9. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Валидация методик «родственные примеси» для неидентифицированных примесей. *Химико-фармацевтический журнал.* 2020;54(9):48–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-48-56.
10. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th ed. Strasbourg: EDQM. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30–32. Available at: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf. Accessed: 04.03.2020.
11. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. London: Eurachem. 2014. P. 24–25. Available at: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. Accessed: 04.03.2020.
12. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A., editors. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. 2nd ed. London: Infoorma healthcare. 2011. 624 p.
13. Эпштейн Н. А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2016;(1):106–117.
14. Ermer J., Nethercote P. W., editors. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2014. 440 p.
15. Эпштейн Н. А. Поправочные коэффициенты в формулах для расчета содержания примесей: сущность, способы определения и их ограничения. *Химико-фармацевтический журнал.* 2019;53(5):55–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-5-55-60.
16. Береговых В. В., ред. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. М.: Литтерра. 2008. 132 с. (Пер. изд.: der Arzneimittel-Hersteller B. Validierung analytischer Verfahren der fiktiven Firma "Muster" fur die Arznemittel-Herstellung. Bonn: BAH; 2004.)
17. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
18. Dong M. W. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. 2nd ed. New Jersey: Wiley; 2019. 416 p.
19. Руководство по трансферу технологий и аналитических методик при производстве лекарственных средств. *ЕАЭС.* 2020. Доступно по: https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0105098/pd_20082020/ Ссылка активна на 04.03.2020.

20. Good Practice Guide: Technology Transfer 3rd Edition. *ISPE*. 2018. Available at: https://ispe.org/publications/guidance-documents/good-practice-guide-technology-transfer-3rd-edition. Accessed: 04.03.2020.
21. World Health Organization WHO Technical Report Series. 2011;961(7):304. Available at: https://www.academia.edu/29872380/Annex_7_WHO_guidelines_on_transfer_of_technology_in_pharmaceutical_manufacturing. Accessed: 04.03.2020.
22. Limberger M., Ermer J., Lis K., Faust T., Astner I., Behrens D., Höwer-Fritzen H., Wätzig H. Transfer of Analytical Procedures: Position Paper. 2014. Available at: https://www.apv-mainz.de/fileadmin/dateiablage/apv-mainz/Publikationen/Pos.papier_027gs-1.pdf. Accessed: 04.03.2020.
23. Limentani G. B., Ringo M. C., Ye F., Berquist M. L., MCSorley E. O. Beyond the t-test: statistical equivalence testing. *Analytical Chemistry*. 2005;77(11):221A–226A. DOI: 10.1021/ac053390m.
24. Schepers U., Wätzig H. Application of the equivalence test according to a concept for analytical method transfers from the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE*), J. Pharm. Biomed. Analysis*.2005;39:310–314.
25. Zhong J., Lee K., Tsong Y. Statistical assessment of analytical method transfer. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 2008;18(5):1005–1012. DOI: 10.1080/10543400802287347.
26. Rozet E., Dewé W., Ziemons E., Bouklouze A., Boulanger B., Hubert Ph. Methodologies for the transfer of analytical methods: A review. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(23):2214–2223. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.049.
27. Kaminski L., Schepers U., Wätzig H. Analytical method transfer using equivalence tests with reasonable acceptance criteria and appropriate effort: extension of the ISPE concept. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2010;53(5):1124–1129. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.04.034.
28. Ermer J., Limberger M., Lis K., Wätzig H. The transfer of analytical procedures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;85:262–276. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.009.
29. Kirschbaum J. J. Inter-laboratory transfer of HPLC methods: Problems and solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1989;7(7):813–833. DOI: 10.1016/0731-7085(89)80002-0.
30. Dolan J. W. Method Transfer *Problems. LC-GC North America.* 2008;26(3);254–260. Available at: https://www.chromatographyonline.com/view/method-transfer-problems-0. Accessed: 04.03.2020.
31. Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons; 2010. 960 p.
32. Hong P., McConville P. R. Dwell Volume and Extracolumn Volume: What Are They and How Do They ImpactMethod Transfer? Milford: Waters Corporation. 2018. Available at: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf. Accessed: 04.03.2020.
33. Yahya A. M., McElnay J. C., D'Arcy P. F. Drug sorption to glass and plastics. *Drug Metabol. Drug Interact*. 1988;6(1):1–45.
34. Carlson M., Thompson R. D. Analyte loss due to membrane filter adsorption as determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science.* 2000; 38(2):77–83. DOI: 10.1093/chromsci/38.2.77.
35. Overcoming Glass Vial Adsorption Effects for Trace Analysis of Basic Compounds by LC/MS/MS. Milford: Waters Corporation. 2011.
36. There's more to HPLC Method Transfer problems than differences in System Dwell Volume! Available at: https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-blog/hplc-chromatography-tips/hplc-methods/hplc-method-transfer-problems. Accessed: 04.03.2020.
37. Как избежать ошибок в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Киев: Алси; 2010. 432 с. (Пер. изд.: P. C. Sadek. Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd.; 1999.)
38. Neue U. D. HPLC Troubleshooting Guide. *Waters*. Available at: https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1528445&locale=ru_RU.

REFERENCES

1. Starchak Yu. A., Gavrilin M. V., Shineva N. V. Transfer of analytical procedures. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):182–187. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-182-187.
2. Riley C. M., Rosanske T. W., Reid G. L. Analytical method transfer. In: Specification of Drug Substances and Products. Development and Validation of Analytical Methods. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 125–148.
3. Briggs R. J., Nicholson R., Vazvaei F., Busch J., Mabuchi M., Mahesh K. S., Brudny-Kloeppel M., Weng N., Galvinas P. A. R., Duchene P., Hu P., Abbott R. W. Method Transfer, Partial Validation, and Cross Validation: Recommendations for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *The AAPS J.* 2014;16(6):1143–1148. DOI: 10.1208/s12248-014-9650-3.
4. United States Pharmacopoeia. USP41–NF36. 2018.
5. European Pharmacopoeia, 9.5th ed. Chapter 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques. EDQM, Strasbourg. 2018.
6. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdanie* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed]. V. 1. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya RF; 2018. P. 867–871. (In Russ.)
7. Epshtein N. A. Revalidation of Procedures and Allowed Adjustments to Chromatography Conditions in Liquid Chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;53(12):1174–1183. DOI: 10.1007/s11094-020-02143-9.
8. Epshtein N. A. About stress experiments by developing/improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;3:118–132. (In Russ.)
9. Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Validation of related impurities determination methods for detecting unidentified substances. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(9):48–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-48-56.
10. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th ed. Strasbourg: EDQM. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30–32. Available at: https://www.edqm.eu/sites/default/files/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf. Accessed: 04.03.2020.
11. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. London: Eurachem. 2014. P. 24–25. Available at: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. Accessed: 04.03.2020.
12. Baertschi S. W., Alsante K. M., Reed R. A., editors. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. 2nd ed. London: Infoorma healthcare. 2011. 624 p.
13. Epshtein N. A. Intermediate precision determination at validation of methods in pharmacy. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2016;1:106–117. (In Russ.)
14. Ermer J., Nethercote P. W., editors. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2014. 440 p.
15. Epshtein N. A. Correction Factors in Formulas for Calculating Impurity Contents: Essence and Determination Methods and Their Limitations. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2019;53(5):55–60. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-5-55-60.
16. Beregovykh V. V., editor. *Validatsiya analiticheskikh metodik dlya proizvoditeleĭ lekarstv* [Validation of analytical procedures for drug manufacturers]. Moscow: Litterra; 2008. 132 p. (Transl. of: der Arzneimittel-Hersteller B. Validierung analytischer Verfahren der fiktiven Firma "Muster" fur die Arznemittel-Herstellung. Bonn: BAH; 2004.). (In Russ.)
17. Epshtein N. A. Validation of analytical procedures: graphic and calculated criteria for assessment of methods linearity in practice. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
18. Dong M. W. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. 2nd ed. New Jersey: Wiley; 2019. 416 p.

19. *Rukovodstvo po transferu tekhnologiy i analiticheskikh metodik pri proizvodstve lekarstvennykh sredstv* [Guidelines for the transfer of technologies and analytical methods in the production of medicines]. *Eurasian Economic Union (EEU)*. 2020. Available at: https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0105098/pd_20082020. Accessed: 04.03.2020. (In Russ.)
20. Good Practice Guide: Technology Transfer 3rd Edition. *ISPE*. 2018. Available at: https://ispe.org/publications/guidance-documents/good-practice-guide-technology-transfer-3rd-edition. Accessed: 04.03.2020.
21. World Health Organization WHO Technical Report Series. 2011;961(7):304. Available at: https://www.academia.edu/29872380/Annex_7_WHO_guidelines_on_transfer_of_technology_in_pharmaceutical_manufacturing. Accessed: 04.03.2020.
22. Limberger M., Ermer J., Lis K., Faust T., Astner I., Behrens D., Höwer-Fritzen H., Wätzig H. Transfer of Analytical Procedures: Position Paper. 2014. Available at: https://www.apv-mainz.de/fileadmin/dateiablage/apv-mainz/Publikationen/Pos.papier_027gs-1.pdf. Accessed: 04.03.2020.
23. Limentani G. B., Ringo M. C., Ye F., Berquist M. L., MCSorley E. O. Beyond the t-test: statistical equivalence testing. *Analytical Chemistry*. 2005;77(11):221A-226A. DOI: 10.1021/ac053390m.
24. Schepers U., Wätzig H. Application of the equivalence test according to a concept for analytical method transfers from the International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE*), J. Pharm. Biomed. Analysis.*2005;39:310–314.
25. Zhong J., Lee K., Tsong Y. Statistical assessment of analytical method transfer. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 2008;18(5):1005–1012. DOI: 10.1080/10543400802287347.
26. Rozet E., Dewé W., Ziemons E., Bouklouze A., Boulanger B., Hubert Ph. Methodologies for the transfer of analytical methods: A review. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(23):2214–2223. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.12.049.
27. Kaminski L., Schepers U., Wätzig H. Analytical method transfer using equivalence tests with reasonable acceptance criteria and appropriate effort: extension of the ISPE concept. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;53(5):1124–1129. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.04.034.
28. Ermer J., Limberger M., Lis K., Wätzig H. The transfer of analytical procedures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;85:262–276. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.009.
29. Kirschbaum J. J. Inter-laboratory transfer of HPLC methods: Problems and solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1989;7(7):813–833. DOI: 10.1016/0731-7085(89)80002-0.
30. Dolan J.W. Method Transfer *Problems. LC-GC North America*. 2008;26(3);254–260. Available at: https://www.chromatographyonline.com/view/method-transfer-problems-0. Accessed: 04.03.2020.
31. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons; 2010. 960 p.
32. Hong P., McConville P. R. Dwell Volume and Extracolumn Volume: What Are They and How Do They ImpactMethod Transfer? Milford: Waters Corporation. 2018. Available at: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf. Accessed: 04.03.2020.
33. Yahya A. M., McElnay J. C., D'Arcy P. F. Drug sorption to glass and plastics. *Drug Metabol. Drug Interact*. 1988;6(1):1–45.
34. Carlson M., Thompson R. D. Analyte loss due to membrane filter adsorption as determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2000; 38(2):77–83. DOI: 10.1093/chromsci/38.2.77.
35. Overcoming Glass Vial Adsorption Effects for Trace Analysis of Basic Compounds by LC/MS/MS. Milford: Waters Corporation. 2011.
36. There's more to HPLC Method Transfer problems than differences in System Dwell Volume! Available at: https://www.crawfordscientific.com/technical/chromatography-blog/hplc-chromatography-tips/hplc-methods/hplc-method-transfer-problems. Accessed: 04.03.2020.
37. *Kak izbezhat' oshibok v vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografi*i [How to avoid mistakes in high performance liquid chromatography]. Kiev: Alsi; 2010. 432 p. (Transl. of: P. C. Sadek. Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd.; 1999.). (In Russ.)
38. Neue U. D. HPLC Troubleshooting Guide. *Waters*. Available at: https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1528445&locale=ru_RU.

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153
УДК 615.1

Оригинальная статья / Research article

Документирование фармацевтической разработки. Часть 2. Документы системы качества

И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова*, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк, В. Д. Метелева

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; И. А. Наркевич – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626; Е. В. Флисюк – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; В. Д. Метелева – https://orcid.org/0000-0001-7641-2114.

Статья поступила: 04.03.2020 **Статья принята в печать:** 09.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. В процессе фармацевтической разработки лекарственного препарата необходимо обосновать состав лекарственного средства; разработать технологию готовой лекарственной формы (включая систему первичной упаковки); создать документацию для различных этапов разработки продукта; провести валидацию аналитических методик и технологических процессов. Информация, получаемая в ходе экспериментальных исследований и разработки лекарственного препарата, включается в регистрационное досье. Документирование фармацевтической разработки позволяет систематизировать знания о мониторинге технологических процессов, показателях качества продукции, представить целостность получаемых данных.

Цель. Создание документации по фармацевтической разработке в рамках фармацевтической системы качества предприятия.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы следующие методы: контент-анализ; системный анализ; системный подход.

Результаты и обсуждение. По фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев в рамках фармацевтической системы качества на основе полученных знаний о процессе и продукте и с учетом анализа рисков нами созданы документы, которые были адаптированы к документообороту предприятия для оптимизации процесса документирования на последующих стадиях жизненного цикла лекарственного препарата. Для оптимального документирования первого этапа создания препарата предложен перечень документов, включающий: отчет о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев; спецификации на исходное сырье и материалы, полупродукты, готовую продукцию; стандартные операционные процедуры на этапе фармацевтической разработки; Руководство по мониторингу процессов и качества продукта; инструкции по корректирующим и предупреждающим действиям (CAPA), по управлению изменениями, по анализу со стороны руководства; отчет по анализу эффективности системы обеспечения качества при фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев. Предлагаемый комплект документов позволяет сформировать единую базу полученных на данном этапе знаний и результатов, их систематизировать и структурировать.

Заключение. В ходе фармацевтической разработки двухкомпонентных суппозиториев сформированы знания о процессе создания продукта надлежащего качества. С учетом полученных знаний разработан комплект документов, состоящий из отчетов, спецификаций, стандартных операционных процедур, инструкций для предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев. Документация по фармацевтической разработке адаптирована к документообороту предприятия для оптимизации процесса документирования на последующих стадиях жизненного цикла лекарственного препарата.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, фармацевтическая система качества, документирование

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. Е. Смехова, Л. В. Шигарова, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк осуществили постановку задачи, обработку результатов. В. Д. Метелева выполнила практические опыты, обработку результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Смехова И. Е., Шигарова Л. В., Наркевич И. А., Флисюк Е. В., Метелева В. Д. Документирование фармацевтической разработки. Часть 2. Документы системы качества. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):147–153. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153

Documentation of Pharmaceutical Development. Part 2. Quality System Documents

Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova*, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk, Valeria D. Meteleva

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; Igor A. Narkevich – https://orcid.org/0000-0002-5483-6626; Elena V. Flisyuk – https://orcid.org/0000-0001-8077-2462; Valeria D. Meteleva – https://orcid.org/0000-0001-7641-2114.

Received: 04.03.2020 **Revised:** 09.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. In the process of pharmaceutical development of a medicinal product, it is necessary to substantiate the composition of the medicinal product; develop a technology for a finished dosage form (including a primary packaging system); create documentation for various stages of product development; validate analytical methods and technological processes. Information obtained in the course of experimental

research and development of a medicinal product is included in the registration dossier. Documenting a pharmaceutical development allows you to systematize knowledge about monitoring technological processes, product quality indicators, and present the integrity of the data obtained.
Aim. Creation of documentation for pharmaceutical development within the pharmaceutical quality system of the enterprise.
Materials and methods. In the course of the research, the following methods were used: content analysis; system analysis; systems approach.
Results and discussion. On the pharmaceutical development of two-component suppositories within the FGC, based on the knowledge gained about the process and the product and taking into account the risk analysis, we have created documents that were adapted to the enterprise's document flow to optimize the documentation process at the subsequent stages of the drug's life cycle. For optimal documentation of the first stage of drug development, a list of documents is proposed, including: Report on the pharmaceutical development of two-component suppositories; specifications for raw materials and materials, intermediate products, finished products; standard operating procedures during the pharmaceutical development phase; Guidelines for monitoring processes and product quality; Instructions for corrective and preventive actions (CAPA), change management, management review; report on the analysis of the effectiveness of the quality assurance system in the pharmaceutical development of two-component suppositories. The proposed set of documents makes it possible to form a single base of knowledge and results obtained at this stage, to systematize and structure them.
Conclusion. In the course of the pharmaceutical development of two-component suppositories, knowledge has been generated about the process of creating a product of proper quality. A set of documents has been developed, consisting of reports, specifications, standard operating procedures, instructions, for an enterprise planning to produce two-component suppositories. Pharmaceutical development documentation is adapted to the enterprise document flow to optimize the documenting process at the subsequent stages of the drug product life cycle.

Keywords: pharmaceutical development, pharmaceutical quality system, documentation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Irina E. Smekhova, Larisa V. Shigarova, Igor A. Narkevich, Elena V. Flisyuk made a setting the problem, processing the results. Valeria D. Meteleva performed practical experiments, processing the results.

For citation: Smekhova I. E., Shigarova L. V., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Meteleva V. D. Documentation of pharmaceutical development. Part 2. Quality system documents. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):147–153. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-147-153

ВВЕДЕНИЕ

Начальным этапом жизненного цикла любого лекарственного препарата (ЛП) является его фармацевтическая разработка, представляющая собой трудоемкий и сложный процесс. На данном этапе закладывается качество продукта, которое затем обеспечивается и непрерывно совершенствуется на протяжении всего жизненного цикла [1, 2].

В процессе фармацевтической разработки ЛП необходимо обосновать состав лекарственного средства; разработать технологию готовой лекарственной формы (включая систему первичной упаковки); создать документацию для различных этапов разработки продукта; провести валидацию аналитических методик и технологических процессов [3].

Информация, получаемая в ходе экспериментальных исследований и разработки ЛП, включается в регистрационное досье. Документирование фармацевтической разработки позволяет систематизировать знания о мониторинге технологических процессов, показателях качества продукции, представить целостность получаемых данных, что обуславливает его актуальность.

Для того чтобы качество, эффективность и безопасность обеспечивались на всех этапах жизненного цикла ЛП, при его фармацевтической разработке должны последовательно реализовываться элементы фармацевтической системы качества (ФСК), на основании которых в дальнейшем и формируется стратегия контроля.

К элементам ФСК относят [4]:

- систему мониторинга эффективности процессов и качества продукта;
- систему корректирующих и предупреждающих действий (CAPA – Corrective Action and Preventive Action);
- систему управления изменениями;
- анализ со стороны руководства.

Элементы ФСК необходимо применять в соответствии с их назначением и с учетом деятельности на определенном этапе жизненного цикла ЛП [5].

Ранее нами был проведен анализ документооборота ФСК предприятия, планирующего выпуск суппозиториев. Установлены сильные и слабые стороны документооборота, выделен ряд предложений для улучшения системы документации [6].

Целью настоящего исследования явилось создание документации по фармацевтической разработке в рамках ФСК предприятия.

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;
- 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.

Системный подход применялся при создании документации на суппозитории в рамках ФСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На этапе фармацевтической разработки ЛП для достижения поставленной цели в области качества следует реализовывать соответствующие элементы ФСК (таблица 1).

При последовательной реализации элементов ФСК создается продукт с надлежащим качеством, который соответствует потребностям пациентов и отвечает требованиям регуляторных органов.

Руководство ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» для структурирования системы документации предлагает использовать процессный подход, который предполагает включение документа, описывающего конкретный процесс, в определенный уровень документации [7]. Классификация документов по уровням при фармацевтической разработке ЛП представлена в таблице 2.

По структуре и содержанию документов можно судить о деятельности организации в целом, о корпоративной культуре качества, о процессе управления знаниями, а также фактическом соблюдении персоналом принципов надлежащих практик.

Таблица 2. Классификация документов при фармацевтической разработке ЛП

Table 2. Classification of documents in the pharmaceutical development of medicinal products

Уровни документов Document levels	Вид документации и ее примеры Type of documentation and its examples
1 уровень Level 1	Руководящие документы: • руководства; • стандарты Guiding documents: • manuals; • standards
2 уровень Level 2	Документы, регламентирующие процессы: • инструкции; • стандартные операционные процедуры (СОП); • спецификации и т. д. Documents regulating the processes: • instructions; • standard operating procedures (SOPs); • specifications, etc.
3 уровень Level 3	Регистрирующие документы: • записи; • отчеты; • листы регистрации; • журналы и т. д. Registration documents: • records; • reports; • registration sheets; • magazines, etc.

Документация должна быть четкой, структурированной, понятной и доступной. Это позволит заведомо предупредить ошибки персонала, вовремя их выявить и устранить как на этапах фармацевтической разработки ЛП, так и на этапах его дальнейшего производства [8–10].

Таблица 1. Назначение элементов ФСК на этапе фармацевтической разработки

Table 1. Purpose of PQS elements at the stage of pharmaceutical development

Элемент ФСК PQS element	Назначение на этапе фармацевтической разработки Appointment at the pharmaceutical development stage
Система мониторинга эффективности процессов и качества продукта Monitoring system for process efficiency and product quality	При мониторинге процессов и качества продукта следует использовать управление знаниями и управление рисками по качеству для формирования эффективной стратегии контроля и обеспечения надлежащего качества продукта при разработке When monitoring processes and product quality, knowledge management and quality risk management should be used to form an effective strategy to control and ensure appropriate product quality during development
Система корректирующих и предупреждающих действий (CAPA) The system of corrective and preventive actions (CAPA)	Система CAPA улучшает понимание процесса и продукта и приводит к их постоянному совершенствованию. Использование методологии CAPA целесообразно при повторяющемся процессе разработки The CAPA system improves process and product understanding and leads to continuous improvement. The use of the CAPA methodology is advisable for a repetitive development process
Система управления изменениями Change control system	Реализация системы управления изменениями должна быть взаимосвязана с этапом фармацевтической разработки для установления надлежащего контроля при внедрении изменений The implementation of the change management system should be interconnected with the pharmaceutical development stage to establish proper control during the implementation of changes
Анализ со стороны руководства Management review	Анализ со стороны руководства проводится для обеспечения адекватности разработки продукта и процесса и гарантии качества продукта и ведения процесса Management reviews are conducted to ensure the adequacy of product and process development and to ensure product quality and process management

В рамках документально оформленной и функционирующей ФСК эффективно реализуется и документирование фармацевтической разработки ЛП, которое состоит из следующих этапов:

- разработка спецификаций на исходное сырье, материалы, полупродукты, готовую лекарственную форму;
- оформление отчетов о проведенных исследованиях;
- разработка СОП в соответствии с технологией;
- создание инструкций по элементам ФСК;
- формирование регистрационного досье на препарат.

Документирование фармацевтической разработки, основанное на реализации элементов ФСК, позволяет разработать стратегию контроля, установить и поддерживать контролируемое состояние на данном этапе.

Так как качество ЛП закладывается на этапе фармацевтической разработки, то надлежащее документирование является основой его обеспечения. При этом система надлежащей документации гарантирует:

- разработку ЛП в соответствии с установленными требованиями;
- проведение контроля качества исходного сырья, материалов, полупродуктов и готовой продукции;
- четкое распределение ответственности персонала при фармацевтической разработке ЛП.

По фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев в рамках ФСК на основе полученных знаний о процессе и продукте и с учетом анализа рисков нами созданы документы, которые были адаптированы к документообороту предприятия для оптимизации процесса документирования на последующих стадиях жизненного цикла ЛП [4]. Для оптимального документирования фармацевтической разработки предложен перечень документов, включающий:

1. Отчет о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев.
2. Спецификации на исходное сырье и материалы, полупродукты, готовую продукцию.
3. СОП на этапе фармацевтической разработки.
4. Руководство по мониторингу процессов и качества продукта.
5. Инструкции:
   - корректирующие и предупреждающие действия (CAPA);
   - управление изменениями;
   - анализ со стороны руководства.
6. Отчет по анализу эффективности системы обеспечения качества (СОК) при фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев.

Краткая характеристика документов по фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев в рамках ФСК представлена в таблице 3.

В соответствии с представленным перечнем документов нами разработана надлежащая документация по фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев в рамках ФСК предприятия, планирующего их выпуск, что является важной составляющей для обеспечения качества продукта и целостности полученных данных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предлагаемый комплект документов позволяет сформировать единую базу полученных на данном этапе знаний и результатов, их систематизировать и структурировать. Данный перечень документов является оптимальным решением по документированию фармацевтической разработки и охватывает все аспекты деятельности в рамках ФСК. Документы созданы по форме, принятой на предприятии для облегчения переноса знаний и полученных данных на последующие стадии жизненного цикла ЛП.

Отчет о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев составлен с учетом требований руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» [11]. Структурные элементы, предусмотренные в I части руководства, соответствуют структуре раздела 3.2.P.2 «Фармацевтическая разработка» модуля 3 регистрационного досье в формате общего технического документа (ОТД).

Отчет подробно описывает компоненты ЛП (активные фармацевтические субстанции, вспомогательные вещества), разработанный состав, допустимый избыток, физико-химические и биологические свойства препарата, технологический процесс, систему упаковки, совместимость [12].

Спецификации на исходное сырье, материалы, полупродукты и готовую продукцию, являющиеся основой для оценки качества ЛП, представлены в соответствующих отчетах:

- отчете о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев;
- отчете по анализу эффективности СОК при фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев.

Для стандартизации технологических процессов разработаны СОПы. Благодаря основным их положениям при создании препарата устанавливается и поддерживается контролируемое состояние всего процесса и качества продукта.

СОПы представлены в виде пошаговых инструкций, организующих единый порядок работы на этапе разработки по проведению следующих операций:

- измельчения действующих веществ;
- смешения действующих веществ;
- плавления основы;
- введения действующих веществ в основу;
- охлаждения суппозиторной массы.

Для каждой процедуры при разработке двухкомпонентных суппозиториев определены критические контрольные точки, по которым необходимо осуществлять контроль соответствия протекания процесса в пределах требуемых параметров.

Таблица 3. Документы по фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев в рамках ФСК

Table 3. Documents on the pharmaceutical development of two-component suppositories in PQS

№	Наименование разработанного документа Name of the developed document	Назначение документа Purpose of the document
1	Отчет о фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев Pharmaceutical Development Report for two-component Suppositories	Создание единой формы сведений о ЛП, полученных в ходе фармацевтической разработки. Структурированные данные, необходимые для внесения в соответствующий раздел регистрационного досье Creation of a unified form of information about medicinal products obtained in the course of pharmaceutical development. Structured data required for entering into the corresponding section of STD
2	Спецификации на: • исходное сырье; • материалы; • полупродукты; • готовую продукцию Specifications for: • API; • materials; • intermediate products; • finished products	Составление перечня показателей, которым должны соответствовать исходное сырье, упаковочные материалы, полупродукты и готовая продукция, использующиеся при разработке продукта. Спецификации являются основой для оценки качества ЛП Compilation of a list of indicators that must be met by APIs, packaging materials, intermediates and finished products used in product development. Specifications are the basis for assessing the quality of medicinal products
3	Стандартные операционные процедуры (СОПы) Standard Operating Procedures (SOPs)	Установление требований по технологическим и контрольным процедурам при разработке препарата Establishment of requirements for technological and control procedures in the development of a drug
4	Руководство по мониторингу процессов и качества продукта Process and product quality monitoring manual	Разработка основных положений для установления и поддержания контролируемого состояния при мониторинге процессов и качества продукта Development of guidelines for establishing and maintaining a controlled state while monitoring processes and product quality
5	Инструкции: • корректирующие и предупреждающие действия (CAPA); • управление изменениями; • анализ со стороны руководства Instructions: • corrective and preventive actions (CAPA); • change control; • management review	Создание основных требований, которые: • регламентируют порядок работы при выявлении несоответствий в ходе мониторинга, установлении причин их появления и оценке результативности выполненных действий; • формализуют деятельность по своевременному и эффективному усовершенствованию процесса и продукта, установление контролируемого состояния при внедрении изменений, способных повлиять на качество продукции или процесс разработки; • устанавливают порядок анализа со стороны руководства, определяют требования к управлению сбором информации и обеспечивают адекватность разработки продукта и процесса Creation of basic requirements that: • regulate the procedure for detecting inconsistencies during monitoring, establishing the reasons for their occurrence and assessing the effectiveness of the actions performed; • formalize activities for the timely and effective improvement of the process and product, the establishment of a controlled state when introducing changes that can affect the quality of the product or the development process; • establish procedures for management review, define requirements for managing information gathering, and ensure the adequacy of product and process development
6	Отчет по анализу эффективности ФСК при фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев Report on the analysis of the effectiveness of PQS in the pharmaceutical development of two-component suppositories	Создание формы сведений об анализе эффективности ФСК при разработке ЛП для оценки ее результативности Creation of a form of information on the analysis of the effectiveness of PQS in the development of medicinal products to assess its effectiveness

Для формирования стратегии контроля мониторинга процессов и качества продукта на этапе фармацевтической разработки двухкомпонентных суппозиториев разработано соответствующее руководство. Документ рассматривает ключевые факторы, которые учитывались при установлении критических контрольных точек и их допустимых пределов, а также при определении уровней тревоги и уровней действия. Его целью является установление контролируемого состояния для своевременного выявления отклонения от требуемых параметров на последующих стадиях жизненного цикла суппозиториев.

Нами также составлена инструкция по проведению корректирующих и предупреждающих действий, регламентирующая порядок работы при выявлении в ходе мониторинга процессов и качества продукта отклонений (несоответствий), установлении причин их появления и оценке результативности выполненных действий. Корректирующие и предупреждающие действия необходимы для устранения в рамках ФСК причин несоответствий и предотвращении их повторения.

Порядок проведения корректирующих и предупреждающих действий включал следующие этапы:

- выявление и регистрация отклонений (несоответствий);
- установление причин отклонений (несоответствий);
- анализ необходимости проведения корректирующих/предупреждающих действий;
- разработка плана корректирующих/предупреждающих действий;
- выполнение корректирующих/предупреждающих действий и документирование результатов предпринятых действий;
- оценка результатов предпринятых действий.

Составлена инструкция по управлению изменениями, которая формализует деятельность по своевременному и эффективному усовершенствованию процесса и продукта. Управление изменениями позволит установить контролируемое состояние на этапе фармацевтической разработки при внедрении изменений, которые способны повлиять на качество продукции или процесс разработки.

Порядок проведения управления изменениями на стадии фармацевтической разработки двухкомпонентных суппозиториев состоял из следующих этапов:

- выявление и классификация изменений;
- инициирование изменений;
- согласование и одобрение проведения изменений;
- составление плана мероприятий по внедрению изменения;
- оценка предложенного изменения;
- реализация изменения;
- оценка эффективности внедрения изменения.

Для проведения анализа СОК со стороны руководства на этапе фармацевтической разработки двухкомпонентных суппозиториев была разработана инструкция, устанавливающая единый порядок анализа, а также определяющая требования к управлению сбором информации и обеспечивающая адекватность разработки продукта и процесса. Порядок проведения анализа СОК состоял из следующих этапов:

- сбор информации о технологических процессах и разрабатываемом продукте;
- проведение анализа СОК разработчиком и составление отчета по полученным данным;
- представление информации о результатах анализа СОК руководству;
- анализ СОК со стороны руководства.

Для оценки результативности функционирования СОК, возможностей ее совершенствования, а также для обеспечения надлежащего качества продукта был составлен отчет по анализу эффективности СОК при фармацевтической разработке двухкомпонентных суппозиториев, включающий разделы:

- анализ рисков;
- информация об исходном сырье и материалах, полупродуктах и готовой продукции;
- информация о технологическом процессе;
- информация по изучению стабильности;
- управление отклонениями;
- корректирующие и предупреждающие действия;
- управление изменениями;
- документация фармацевтической системы качества;
- заключение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе фармацевтической разработки двухкомпонентных суппозиториев сформированы знания о процессе создания продукта надлежащего качества. С учетом полученных знаний разработан комплект документов, состоящий из отчетов, спецификаций, СОП, инструкций для предприятия, планирующего выпуск двухкомпонентных суппозиториев.

Документация по фармацевтической разработке адаптирована к документообороту предприятия для оптимизации процесса документирования на последующих стадиях жизненного цикла ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рожнова С. А., Цыпкина А. В. Анализ системы организации фармацевтической разработки лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017;3(20):170–176.
2. Бркич Г. Э., Пятигорская Н. В., Береговых В. В., Зырянов О. А., Дёмина Н. Б., Бахрушина Е. О. Изучение физико-химических свойств нового оригинального ноотропного средства ТСТ-9. *Биомедицинская химия*. 2020;66(3):257–264.
3. 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.
4. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Avaliable at: http://www.ich.org. Ссылка активна на 22.03.2020.
5. Александров А. В. Первый принцип GMP: постоянное совершенствование системы качества фармацевтической компании. *Группа компаний ВИАЛЕК*. Avaliable at: http://www.vialek.ru/press/articles/653/ Ссылка активна на 22.03.2020.
6. 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.
7. Никитюк В. Г., Шакина Т. Н. Надлежащая документация фармацевтической компании – систематизация, структурирование, управление и оценка. Часть 1. Структурирование и систематизация процессов и системы надлежащей документации. *Фармацевтическая отрасль*. 2016;2(55):78–83.
8. Артамонова М. А., Голубинский Ю. М. Разработка документированной процедуры системы менеджмента качества по управлению документацией. VII Международная студенческая научная конференция Студенческий научный форум – 2015. 15 февраля – 31 марта 2015. Avaliable at: https://scienceforum.ru/2015/article/2015013197. Ссылка активна на 22.03.2020.
9. Пятигорская Н. В., Береговых В. В., Аладышева Ж. И., Беляев В. В., Мешковский А. П., Пятигорский А. М. Система автоматизированного документооборота системы управления качеством фармацевтического предприятия в соответствии с требованиями GMP. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017;72(2):126–133.
10. Крючков Д. В., Бацина Е. А., Данильченко Я. В., Карась Д. В., Артамонова Г. В. Опыт перехода на риск-ориентированную модель системы менеджмента качества медицинской организации.

Здравоохранение Российской Федерации. 2017;61(6):309–315. DOI: 10.18821/0044-197X-2017-61-6-309-315.
11. ICHQ8 Pharmaceutical development. Avaliable at: http://www.ich.org.
12. Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б., Шохин И. Е., Новожилов О. В., Мешковский А. П., Спицкий О. Р. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. М.: Перо; 2015. 526 с.

REFERENCES

1. 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.)
2. Brkich G. E., Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V., Zyryanov O. A., Demina N. B., Bakhrushina E. O. The development of the physicochemical characteristics of the new original nootropic substance TST-9. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2020;66(3):257–264. (In Russ.)
3. Gildeeva G. N., Belostockiy A. V. *Kontseptsiya Quality-by-Design kak klyuchevoy element v obespechenii kachestva lekarstvennykh preparatov* [Quality-by-Design concept as a key element in ensuring the quality of medicines]. *Remedium. Zhurnal o rossiyskom rynke lekarstv i meditsinskoy tekhnike.* 2017;3:54–57. (In Russ.)
4. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System. Avaliable at: http://www.ich.org. Accessed: 22.03.2020.
5. Alexandrov A. V. The first GMP principle: continuous improvement of the pharmaceutical company's quality system. VIALEK group of companies. Electronic resource. Avaliable at: http://www.vialek.ru/press/articles/653/ Accessed: 22.03.2020. (In Russ.)
6. 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.)
7. Nikityuk V. G., Shakina T. N. *Nadlezhashchaya dokumentatsiya farmatsevticheskoy kompanii – sistematizatsiya, strukturirovanie, upravlenie i otsenka. Chast' 1. Strukturirovanie i sistematizatsiya protsessov i sistemy nadlezhashchey dokumentatsii* [Pharmaceutical company proper documentation – systematization, structuring, management and evaluation Part 1. Structuring and systematization of processes and a system of proper documentation]. *Farmatsevticheskaya otrasl' = Pharmaceutical industry Review.* 2016;2(55):78–83. (In Russ.)
8. Artamonova M. A., Golubinsky Yu. M. *Razrabotka dokumentirovannoy protsedury sistemy menedzhmenta kachestva po upravleniyu dokumentatsiey. VII Mezhdunarodnaya studencheskaya nauchnaya konferentsiya Studencheskiy nauchnyy forum – 2015.* [Development of a documented quality management system procedures for managing documents]. February 15 to March 31, 2015. Avaliable at: https://scienceforum.ru/2015/article/2015013197. Accessed: 22.03.2020. (In Russ.)
9. Pyatigorskaya N. V., Beregovykh V. V., Aladysheva Zh. I., Belyaev V. V., Meshkovskii A. P., Pyatigorskii A. M. Automated document management system of pharmaceutical manufacturer's quality management system in accordance with requirements of GMP. *Vestnik Rossiiskoi akademii medetsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72(2):126–133. (In Russ.)
10. Kryuchkov D. V., Batsina E. A., Danil'chenko Ia.V., Karas' D. V., Artamonova G. V. The experience of transition to risk-oriented model of system of quality management in medical organization. *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii = Health Care of the Russian Federation.* 2017;61(6):309–315. (In Russ.) DOI: 10.18821/0044-197X-2017-61-6-309-315.
11. ICHQ8 Pharmaceutical development. Avaliable at: http://www.ich.org.
12. Bykovskiy S. N., Vasilenko I. A., Demina N. B., Shokhin I. E., Novozhilov O. V., Meshkovskiy A. P., Spitskiy O. R. *Farmatsevticheskaya razrabotka: kontseptsiya i prakticheskie rekomendatsii* [Pharmaceutical Development: Concept and Practical Guidelines]. Moscow: Pero; 2015. 526 p. (In Russ.)

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-155-161
УДК [347.77:615.2/3](479.22)

Оригинальная статья / Research article

Характеристика системы государственной регистрации лекарственных препаратов в Республике Грузия как потенциал развития отечественных производителей

А. В. Фотеева[1], О. С. Баршадская[1], Н. Б. Ростова[2,3]*

[1] ООО «Парма Клиникал», 614113, Россия, г. Пермь, ул. Причальная, здание 16
[2] ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (ПГФА), 614081, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2
[3] ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

***Контактное лицо:** Ростова Наталья Борисовна. **E-mail:** n-rostova@mail.ru

ORCID: А. В. Фотеева – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848; О. С. Баршадская – https://orcid.org/0000-0003-3775-5557; Н. Б. Ростова – https://orcid.org/0000-0001-5579-394X.

Статья поступила: 27.08.2020 **Статья принята в печать:** 30.04.2021 **Статья опубликована:** 25.05.2021

Резюме

Введение. Важной задачей отечественных производителей является повышение доли экспорта выпускаемой продукции. Для решения данной задачи важно понимать условия вывода в обращение лекарственных препаратов в зависимости от регламентированного порядка в странах, имеющих привлекательные условия для развития бизнеса.
Цель. Изучить порядок государственной регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов (ЛП) в Республике Грузия (от подачи заявления в уполномоченный орган, включая экспертизу досье, экспертизу качества и выдачу регистрационного удостоверения) для потенциального вывода лекарственных препаратов на фармацевтический рынок.
Материалы и методы. В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах, официальные интернет-сайты, нормативно-законодательные документы, регламентирующие порядок регистрации лекарственных препаратов в РФ и Республике Грузия, документы регистрационного досье. Применялись методы сравнительного и единовременного анализа, обобщения и группировки информации из регламентирующих и рекомендательных документов.
Результаты и обсуждение. Были установлены сходства и различия в процессах регистрации лекарственных препаратов, сроках, нормативных документах в Российской Федерации и Республике Грузия. Определен ряд аспектов, благоприятствующих регистрации лекарственных препаратов в Республике Грузия.
Заключение. Обзор процедуры государственного регулирования в сфере обращения лекарственных средств в Республике Грузия позволяет сделать вывод о благоприятных условиях для государственной регистрации препаратов российских производителей.

Ключевые слова: регистрация лекарственных препаратов, регистрационное удостоверение, порядок регистрации в Республике Грузия и в России, регистрационное досье, экспорт лекарственных препаратов

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Авторы совместно продумывали концепцию статьи, проводили поиск и сбор фактического материала в доступных публикациях в рецензируемых журналах, нормативно-законодательных актах, на официальных интернет-сайтах, писали текст статьи и оформляли его в соответствии с общемедицинским профилем журнала. А. В. Фотеева проверяла статью. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Фотеева А. В., Баршадская О. С., Ростова Н. Б. Характеристика системы государственной регистрации лекарственных препаратов в Республике Грузия как потенциал развития отечественных производителей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):155–161. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-155-161

Description of the System of State Registration of Medicines in the Republic of Georgia as a Development Potential of Domestic Manufacturers

Alexandra V. Foteeva[1], Olga S. Barshadskaya[1], Natalya B. Rostova[2,3]*

[1] LLC Parma Clinical, building 1b, Prichalnaya str., Perm, 614113, Russia
[2] Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya str., Perm, 614081, Russia
[3] Perm State University PSU, 15, Bukireva str., Perm, 614990, Russia

***Corresponding author:** Natalya B. Rostova. **E-mail:** n-rostova@mail.ru

ORCID: Alexandra V. Foteeva – https://orcid.org/0000-0002-3752-7848; Olga S. Barshadskaya – https://orcid.org/0000-0003-3775-5557; Natalya B. Rostova – https://orcid.org/0000-0001-5579-394X.

Received: 27.08.2020 **Revised:** 30.04.2021 **Published:** 25.05.2021

Abstract

Introduction. One of the main business objectives of Russian pharmaceutical companies is export development. To obtain marketing authorization in countries with a good potential for business it is of greater importance to be competent in drugs registration procedure.
Aim. The purpose of this study is to overview general aspects of registration procedure for generic drugs in Georgia for potential launching on pharmaceutical market.

Materials and methods. For research purposes we have utilized data obtained from research articles, official websites, regulatory documents for drug registration procedure in both Russian Federation and Republic of Georgia, and documents of registration dossier. Also for this research we have applied benchmarking study, generalized and classified obtained information.
Results and discussion. The similarities and differences of drug registration procedure have been determined, e.g. timelines, dossier format, and legal frameworks in both Russian Federation and Republic of Georgia. Also we have emphasized a list of features that could be benefiting for drug registration in Georgia.
Conclusion. A review of the state regulation procedure in the field of drug circulation in the Republic of Georgia allows us to conclude that there are favorable conditions for state registration of drugs from a Russian manufacturer.

Keywords: drug registering, marketing authorization, authorization procedure in Russian Federation and Georgia Republic, registration dossier, drug products export

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. The authors jointly thought out the concept of the article, searched for and collected factual material in available publications in peer-reviewed journals, official Internet sites, regulatory and legislative acts, wrote the text of the article and designed it in accordance with the general medical profile of the journal. A. V. Foteeva checked the article. All the authors participated in the discussion of the results.

For citation: Foteeva A. V., Barshadskaya O. S., Rostova N. B. Description of the system of state registration of medicines in the Republic of Georgia as a development potential of domestic manufacturers. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):155–161. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-155-161

ВВЕДЕНИЕ

Страна Грузия: дислокация – Европа, статус – ООН, столица – Тбилиси. В 2019 году население Грузии оценивалось в 3,72 млн человек; площадь: 69 700 км^2; валюта: лари (GEL). Фармацевтический рынок Грузии относительно небольшой – 200 млн долл., темпы роста относительно невелики. Характерными особенностями фармацевтического рынка Грузии являются низкая доля национальных производителей и высокая зависимость от импорта, доля локальных производителей в денежном выражении около 15 % [1].

По данным рейтинга легкости ведения бизнеса «Doing business 2020», опубликованного Всемирным банком, Грузия разместилась на 7 позиции [2]. Достаточно высокая позиция в этом рейтинге характеризует благоприятные условия для ведения любого бизнеса, в том числе фармацевтического. В Грузии созданы привлекательные условия для ввоза и обращения лекарственных средств (ЛС): введен упрощенный режим допуска для лекарственных препаратов (ЛП), одобренных странами с высокими регуляторными требованиями, отсутствует НДС, отменено лицензирование импорта, разрешен параллельный импорт.

Процедура регистрации медицинских изделий в Грузии отсутствует (за исключением стоматологических материалов, тест-систем, реагентов и аллергенов), а для импорта и введения в обращение необходимо получить разрешение Министерства здравоохранения (МЗ) Грузии [3].

Похожим образом обстоит ситуация и со специальными пищевыми продуктами и косметическими средствами: они не проходят регистрацию, однако до ввоза необходимо получить письмо от МЗ Грузии относительно классификации продукта и отсутствия требований к его регистрации [3].

В целом долгосрочное закрепление на грузинском рынке перспективно не только с точки зрения получения возможностей продвижения фармацевтической продукции, но и позволяет существенно наращивать объемы продаж и повышать доходность экспорта российских производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования выступали доступные публикации в рецензируемых журналах, официальные интернет-сайты, нормативно-законодательные документы, регламентирующие порядок регистрации лекарственных препаратов в РФ и Республике Грузия, документы регистрационного досье. Применялись методы сравнительного и единовременного анализа, обобщения и группировки информации из регламентирующих и рекомендательных документов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой связи цель настоящего исследования – изучение порядка государственной регистрации воспроизведенных ЛП в Республике Грузия в сравнении с порядком, регламентированным в России.

В большинстве стран мира регистрация ЛС является центральным элементом законодательства об обращении ЛС [4].

Согласно закону «О лекарствах и фармацевтической деятельности» обращение ЛС на рынке Грузии разрешается после процедуры «допуска фармацевтического продукта на рынок». Допуск подразумевает проведение экспертизы и внесение ЛС в ведомственный реестр [3]. Лекарственные средства проходят регистрацию либо *путем экспертизы* (*полная процедура*), либо *путем признания (сокращенная процедура*).

Признание государственной регистрации (*сокращенная процедура*) применяется лишь для ЛС, зарегистрированных компетентными органами с высокими регуляторными требованиями, согласно перечню, установленному правительством Грузии. Система регистрации новых препаратов в Евросоюзе достаточна сложна. Она включает ряд процедур разного уровня [5]. В данный перечень включены следующие органы: EMA (Европейское агентство лекарств), государственные регулирующие органы стран-членов ЕС, США, Австралии и Новой Зеландии, Канады, Японии, Кореи, Швейцарии и некоторых других стран [3]. Необходимо отметить, что Россия не входит в этот перечень.

Таким образом, для организаций – держателей регистрационных удостоверений (РУ), зарегистрировавших ЛП в РФ и некоторых странах СНГ, упрощенная процедура государственной регистрации для их вывода на грузинский фармацевтический рынок не подходит. Результаты анализа процедуры регистрации воспроизведенных ЛП по отдельным аспектам в РФ и Грузии представлены в таблице 1.

В России в соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [6] определен орган, ответственный за процедуру регистрации ЛП, – уполномоченный федеральный орган исполнительной власти – Министерство здравоохранения (МЗ) Российской Федерации [7].

Регистрацию ЛС в Республике Грузия выполняет Министерство труда, здравоохранения и социальных дел Грузии, а компетентным органом, выполняющим экспертизу регистрационных материалов, является Агентство государственного регулирования медицинской деятельности Грузии (веб-сайт: moh.gov.ge) [8].

Порядок и механизм государственной регистрации ЛС в России определяются законом № 61-ФЗ, главой 6 «Осуществление государственной регистрации ЛП», состоящей из 37 статей [6].

В Республике Грузия порядок и механизм государственной регистрации ЛС закреплен в следующих законодательных актах:

- ✓ Закон Грузии «О лекарствах и фармацевтической деятельности» № 1586 от 10.08.2009 г. [9].
- ✓ Постановление Правительства Грузии № 350 от 15 июля 2015 г. об утверждении Технического регламента «Об утверждении порядка маркировки фармацевтического продукта, допущенного на рынок Грузии в национальном режиме государственной регистрации фармацевтического продукта» [10].
- ✓ Общий административный кодекс Грузии, статья 78 [11].

В РФ в соответствии с законом № 61-ФЗ государственная регистрация ЛП осуществляется на имя юридического лица, при этом заявителем на регистрацию может быть как разработчик, так и другое юридическое лицо (по поручению организации-разработчика ЛС).

Регистрация в Грузии также выполняется на имя Заявителя (юридическое лицо, юридическое лицо-нерезидент, производитель). Заявитель несет ответственность за качество, безопасность и эффективность ЛС.

Регистрационное досье в Грузии формируют в национальном формате, в отличие от России, где регламентирован ОТД-формат (Общий технический документ) [6]. Национальный формат досье в Грузии подразумевает две части: административную и научно-техническую [9]. Несмотря на то что российское досье состоит из четырех частей, состав разделов обеих частей в грузинском досье почти в точности повторяет формат ОТД, требуемый в Минздраве РФ. Отличие состоит в том, что досье для России содержит дополнительно проект нормативной документации и вместе с другими утверждаемыми Минздравом документами (инструкция по медицинскому применению, проекты макетов упаковки) предоставляется в четырех экземплярах. Заявление на государственную регистрацию в России подается в двух экземплярах.

Документы административной части регистрационного досье для Агентства в Грузии подаются на грузинском языке в одном экземпляре в бумажном виде и включают в себя:

- ✓ заявление с указанием прилагаемых документов (оригинал);
- ✓ доверенность на лицо, уполномоченное представлять интересы заявителя (производителя) (оригинал);
- ✓ лицензию на право производства (нотариально заверенную копию);
- ✓ образец стандартной упаковки регистрируемого ЛП (или в виде электронной версии);
- ✓ перевод инструкции на грузинский язык (также в виде электронной версии в формате Word на компакт-диске);
- ✓ маркировку.

Требования к отдельным документам из административной части, подаваемым на бумажном носителе:

- маркировка (информация, представленная на первичной и/или вторичной упаковке) может быть выполнена на грузинском и/или русском, и/или на английском языках, допускается регистрация мультиязычной упаковки [3];
- инструкция по медицинскому применению (регламентирующими правилами в Грузии не предусмотрено специальных требований в отношении структуры и содержания данного документа, допускается включение в регистрационное досье инструкции по медицинскому применению, утвержденной в государстве производителя, с переводом на грузинский язык).

Таблица 1. **Сравнительная характеристика системы регистрации воспроизведенных лекарственных препаратов в Российской Федерации и Республике Грузия**

Table 1. **Comparative characteristics of the system of registration of generic medicines in the Russian Federation and the Republic of Georgia**

№	Сравниваемые аспекты Compared aspects	Российская Федерация Russian Federation	Республика Грузия Republic of Georgia
1	Уполномоченный орган, осуществляющий регистрацию ЛП The authorized body that registers the medicines	Министерство здравоохранения Российской Федерации [7] Ministry of Health of the Russian Federation [7]	Агентство государственного регулирования медицинской деятельности Грузии [8] Agency for State Regulation of Medical Activities of Georgia [8]
2	Нормативно-правовое регулирование процесса регистрации Regulatory and legal regulation of the registration process	ФЗ № 61 от 12.04.2010 «Об обращении лекарственных средств» [6] Federal Law No. 61 of 12.04.2010 "On the circulation of medicines" [6]	1. Закон Грузии «О лекарствах и фармацевтической деятельности» № 1586 от 10.08.2009 г. [9]. 2. Постановление Правительства Грузии № 350 от 15 июля 2015 г. об утверждении Технического регламента «Об утверждении порядка маркировки фармацевтического продукта, допущенного на рынок Грузии в национальном режиме государственной регистрации фармацевтического продукта» [10] 1. Law of Georgia "On Medicines and Pharmaceutical Activities" No. 1586 of 10.08.2009 [7]. 2. Resolution of the Government of Georgia No. 350 of July 15, 2015 On Approval of the Technical Regulations "On Approval of the Procedure for Labeling a Pharmaceutical Product Admitted to the Georgian Market under the National Regime of State Registration of a Pharmaceutical Product" [10]
3	Заявитель (владелец регистрации) Applicant (registrant)	Юридическое лицо, производитель или разработчик Legal entity, manufacturer or developer	Юридическое лицо-нерезидент, производитель Legal entity-non-resident, manufacturer
4	Характеристика регистрационного досье Characteristics of the registration dossier	Национальный формат, общий технический документ National format general technical document	Национальный формат досье National dossier format
5	Различия в форматах подачи досье Differences in dossier submission formats	Раздел документации административного характера [6] Section of administrative documentation [6]	Административная часть [9] Administrative part [9]
		Раздел химической, фармацевтической и биологической документации [6] Section of chemical, pharmaceutical and biological documentation [6]	
		Раздел фармакологической, токсикологической документации [6] Section of pharmacological, toxicological documentation [6]	Научно-техническая часть [9] Scientific and technical part [9]
		Раздел клинической документации [6] Section of clinical documentation [6]	
6	Порядок экспертиз при регистрации The procedure for expert examinations during registration	Экспертиза документов Examination of documents	Административная экспертиза регистрационных документов Administrative examination of registration documents
		Экспертиза качества ЛС Examination of the quality of medicines	Научно-техническая экспертиза регистрационных документов Scientific and technical expertise of registration documents
			Лабораторная экспертиза Laboratory examination
7	Сроки экспертизы документов при государственной регистрации Terms of examination of documents during state registration	9 месяцев 9 months	3 месяца 3 months
8	Документ, подтверждающий регистрацию ЛП Document confirming the registration of the medicines	Регистрационное удостоверение Registration certificate	Регистрационный сертификат на фармацевтический продукт Registration certificate for a pharmaceutical product

Окончание табл. 1

№	Сравниваемые аспекты Compared aspects	Российская Федерация Russian Federation	Республика Грузия Republic of Georgia
9	Срок действия регистрации Registration validity period	Бессрочно Indefinitely	5 лет 5 years
	Впервые регистрируемые ЛП First-time registered medicines	5 лет 5 years	5 лет 5 years
10	Система фармаконадзора Pharmacovigilance system	Уполномоченное лицо по фармаконадзору организации-производителя Authorized person for pharmacovigilance of the manufacturing organization	Данное требование отсутствует There is no such requirement
11	Подтверждение регистрации Confirmation of registration	Заявление представляется не ранее чем за 6 месяцев до истечения срока действия РУ [6] The application is submitted no earlier than 6 months before the expiration of the registration certificate [6]	Заявление представляется не позднее 2 месяцев до истечения срока действия РУ The application is submitted no later than 2 months before the expiration of the registration certificate

Документы научно-технической части подаются в электронном виде и включают в себя информацию по следующим разделам и предоставляются на грузинском, русском или английском языках, а также в виде электронной версии на компакт-диске:

- ✓ химический состав ЛП с указанием входящих в него всех ингредиентов и их количеств в единице дозы;
- ✓ надлежащий документ о праве воспроизводства по лицензии на ЛП (при наличии);
- ✓ монографии или указания на монографии, имеющиеся в международных сборниках стандартов, об активной субстанции (спецификация и методы анализа);
- ✓ наименование и адрес производителя активной субстанции;
- ✓ монографии о методах анализа ЛП, включая спецификацию;
- ✓ схема технологического процесса производства ЛП;
- ✓ образец ЛП; необходимое для двух анализов количество, добавленное к двум стандартным упаковкам, с соответствующим сертификатом качества;
- ✓ референс-стандарт в достаточном количестве для проведения двух анализов с соответствующим сертификатом качества;
- ✓ данные о стабильности фармацевтического продукта;
- ✓ данные о биоэквивалентности / терапевтической эквивалентности с учетом формы и путей введения ЛП (по рекомендации ВОЗ);
- ✓ публикации и библиография.

Все вышеперечисленные документы являются составной частью регистрационного досье, подаваемого в Минздрав РФ.

Началом регистрации ЛП в РФ является экспертиза материалов регистрационного досье. Далее следует экспертиза качества и отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения, осуществляемая после проведения формальной экспертизы. Получение положительных результатов экспертизы документов и испытаний его качества, безопасности и эффективности – необходимое условие вывода препарата на рынок.

В Грузии документы на экспертизу подаются в Агентство (включая оригиналы аналитических паспортов качества ЛП от производителя) вместе с образцами готового ЛП и референтными стандартами, необходимыми для проведения двукратного анализа, образцами фармацевтической субстанции. Агентство осуществляет административную экспертизу регистрационных документов. Регистрационные документы на основании положительного заключения административной экспертизы подлежат дальнейшей научно-технической экспертизе в целях стандартизации, установления качества, безопасности и терапевтической эффективности ЛП.

Что касается сроков регистрации, необходимо отметить, что регламентированный срок процедуры в Грузии значительно короче аналогичного в России и составляет три месяца (без учета задержек со стороны производителя в предоставлении ответов на замечания). В ходе экспертизы у компетентного органа могут возникнуть замечания, для устранения которых Заявителю предоставляется срок до 2 месяцев. Лекарственный препарат может быть отклонен с процедуры регистрации в случае невозможности устранить замечания в указанный срок [3].

В РФ документом, подтверждающим факт государственной регистрации ЛП, является РУ, которое выдается бессрочно. Исключение составляют впервые регистрируемые в Российской Федерации ЛП, на которые срок действия РУ ограничивается 5 годами, а по истечении 5 лет при условии подтверждения государственной регистрации данного ЛП выдается *бессрочное* РУ.

Регистрационное удостоверение на ЛП в Грузии выдается сроком на 5 лет. «Обращение фармацевтического продукта на территории Грузии разрешается в течение 5 лет после его регистрации, а после истечения срока регистрации – до истечения срока его годности» [9]. Точно так же, как и на территории Российской Федерации, ЛП срок действия РУ на который закончился, может находиться в гражданском обороте, т. е. продаваться и применяться вплоть до окончания срока годности, если в отношении конкретного ЛП уполномоченными государственными органами не принято специального решения об изъятии его из оборота.

В соответствии с законом № 61-ФЗ «Лекарственные препараты, находящиеся в обращении в Российской Федерации, подлежат мониторингу эффективности и безопасности в целях выявления возможных негативных последствий их применения, индивидуальной непереносимости, предупреждения медицинских работников, специалистов в области ветеринарии, пациентов или владельцев животных и их защиты от применения таких лекарственных препаратов» [6], что определяет обязательства держателей РУ по формированию и функционированию системы фармаконадзора.

Однако при проведении государственной регистрации в Грузии у Заявителя нет обязательств по созданию и поддержанию системы фармаконадзора. Отдельные субъекты обращения и применения ЛП (лечащие врачи, специалисты служб лечебно-профилактической сети и структуры МЗ) обязаны предоставлять Агентству лекарств информацию обо всех случаях побочного действия ЛП. Сведения о побочных реакциях подаются в бумажном виде с подписью и печатью организации.

В РФ в ходе экспертизы качества рассматриваемого на регистрацию ЛП может быть назначена комиссия экспертов с целью выездной проверки условий производства, при этом на время проведения инспекции процедура экспертизы ЛП приостанавливается. В Республике Грузия инспектирование производства не предусмотрено законодательством.

Для повторной регистрации фармацевтического продукта регистрационные документы должны быть представлены не позднее 2 месяцев до истечения срока регистрации. В противном случае регистрация фармацевтического продукта осуществляется в режиме первичной регистрации [9]. В результате перерегистрации выдается свидетельство на следующие 5 лет. В России заявление о подтверждении государственной регистрации ЛП для медицинского применения представляется в соответствующий уполномоченный федеральный орган исполнительной власти не ранее чем за сто восемьдесят дней до истечения срока действия РУ лекарственного препарата для медицинского применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение порядка государственной регистрации воспроизведенных ЛП в Республике Грузия в сравнении с порядком, регламентированным в России, показало, что организации, зарегистрировавшие воспроизведенные ЛП в соответствии с установленным порядком в РФ, имеют все необходимые документы и исследования, достаточные для организации процедуры регистрации ЛП в Грузии. При этом проведенное изучение выявило ряд положительных аспектов в порядке вывода ЛП на фармацевтический рынок Грузии:

- ✓ юридическое лицо-нерезидент Грузии может выступать в качестве заявителя на регистрацию ЛП;
- ✓ регламентированы более короткие сроки экспертизы документов регистрационного досье в Агентстве Грузии;
- ✓ формат регистрационного досье Грузии повторяет разделы досье формата ОТД, установленного в России;
- ✓ инструкция для медицинского применения и макеты упаковки, утвержденные в стране-производителя, принимаются в Грузии;
- ✓ отсутствует процедура инспектирования площадки производителя ЛП со стороны уполномоченного органа Грузии;
- ✓ отсутствует необходимость уполномоченного лица на территории Грузии, отвечающего за организацию системы фармаконадзора;
- ✓ принятие решения о перерегистрации ЛП в Грузии возможно за непродолжительный период, предшествующий окончанию сроков регистрации.

Сравнительный анализ основных нормативно-законодательных документов по регистрации воспроизведенных ЛП в РФ и Республике Грузия показывает, что совокупность требований, предъявляемых к процедуре государственной регистрации в Грузии, не превышает в целом требования законодательства РФ. Несмотря на это, национальное законодательство Республики Грузия обеспечивает надлежащее качество, эффективность и безопасность выводимых на рынок ЛП и служит надежной гарантией здоровья и жизни пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кошель М. С., Габриелян Н. В., Парфейников С. А., Скулкова Р. С., Бережная Е. С. Современное состояние фармацевтических рынков стран СНГ. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;5:1–8.
2. Всемирный банк Doing business 2020 г. Доступно по: https://russian.doingbusiness.org/ru/data/exploreeconomies/georgia. Ссылка активна на 22.04.2021.
3. Компании «Кратия». Доступно по: https://cratia.ua/registraciya-medicinskoy-produkcii-v-stranah-stranah-postsovetskogo-prostranstva/gruziya.html. Ссылка активна на 22.04.2021.
4. Кугач А. А., Кугач В. В. Системы ускоренного доступа лекарственных препаратов на фармацевтический рынок. *Вестник фармации*. 2020;3(89):6–18.
5. Мешковский А. П. Регистрация лекарственных препаратов в Европейском союзе. *Медицинские технологии. Оценка и выбор*. 2014;1(15):46–56.
6. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Доступно по: https://base.garant.ru/12174909/ Ссылка активна на 22.04.2021.
7. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: https://minzdrav.gov.ru/ Ссылка активна на 22.04.2021.

8. Агентство Государственного Регулирования медицинской деятельности Грузии. Доступно по: moh.gov.ge. Ссылка активна на 22.04.2021.
9. Закон Грузии от 10.08.2009 № 1586 «О лекарствах и фармацевтической деятельности». Доступно по: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/29836?publication=25. Ссылка активна на 22.04.2021.
10. Постановление Правительства Грузии от 15.07.2015 № 350. Технический регламент «Об утверждении порядка маркировки фармацевтического продукта, допущенного на рынок Грузии в национальном режиме государственной регистрации фармацевтического продукта». Доступно по: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/1659419?publication=32. Ссылка активна на 22.04.2021.
11. Общий административный кодекс Грузии от 25.06.1999 г. Доступно по: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/16492. Ссылка активна на 22.04.2021.

REFERENCES

1. Koshel M. S., Gabrielyan N. V., Parfeynikov S. A., Skulkova R. S., Berezhnaya E. S. Current status of pharmaceutical CIS markets. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014;5:1–8. (In Russ.)
2. *Vsemirnii bank Doing business 2020 g.* [The World Bank Doing business 2020]. Available at: https://russian.doingbusiness.org/ru/data/exploreeconomies/georgia. Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
3. *Kompanii "Kratiya"* [The site of the Cratia company]. Available at: https://cratia.ua/registraciya-medicinskoy-produkcii-v-stranah-stranah-postsovetskogo-prostranstva/gruziya.html. Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
4. Kuhach A. A., Kuhach V. V. Accelerated access systems of medicines to the pharmaceutical market. *Vestnik farmatsii*. 2020;3(89):6–18. (In Russ.)
5. Meshkovski A. P. Marketing Authorization of Medicinal Products in the European Union. *Medicinskie tehnologii. Ocenka i vibor = Medical Technologies. Assessment and Choice*. 2014;1(15):46–56. (In Russ.)
6. *Federal'nyy zakon ot 12.04.2010 № 61-FZ "Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv"* [Federal Law of 12.04.2010 No. 61-FZ "On the Circulation of Medicines"]. Available at: https://base.garant.ru/12174909/ Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
7. *Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii* [Ministry of Health of the Russian Federation]. Available at: https://minzdrav.gov.ru/ Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
8. *Agentstva Gosudarstvennogo Regulirovaniya meditsinskoy deyatel'nosti Gruzii* [Agency for State Regulation of Medical Activity of Georgia]. Available at: moh.gov.ge. Accessed: 22.04.2021. (In Georgian.)
9. *Zakon Gruzii ot 10.08.2009 № 1586 "O lekarstvakh i farmatsevticheskoy deyatel'nosti"* [Law of Georgia dated 10.08.2009 No. 1586 "On Medicines and Pharmaceutical Activities"]. Available at: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/29836?publication=25. Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
10. *Postanovlenie Pravitel'stva Gruzii ot 15.07.2015 № 350. Tekhnicheskiy reglament "Ob utverzhdenii poryadka markirovki farmatsevticheskogo produkta, dopushchennogo na rynok Gruzii v natsional'nom rezhime gosudarstvennoy registratsii farmatsevticheskogo produkta"* [Resolution of the Government of Georgia No. 350 dated July 15, 2015. Technical Regulations "On Approval of the Procedure for Labeling a Pharmaceutical Product Admitted to the Market of Georgia under the National Regime of State Registration of a Pharmaceutical Product"]. Available at: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/1659419?publication=32. Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)
11. Obshchiy administrativnyy kodeks Gruzii ot 25.06.1999 g. [General Administrative Code of Georgia dated June 25, 1999]. Available at: https://matsne.gov.ge/ru/document/view/16492. Accessed: 22.04.2021. (In Russ.)

СКАЧИЛОВА СОФИЯ ЯКОВЛЕВНА

27 марта известный российский ученый, проработавший более 60 лет в области создания лекарственных препаратов, **Скачилова София Яковлевна** отметила 90-летний юбилей.

С. Я. Скачилова – доктор химических наук, профессор. Обучалась в аспирантуре у академика **Я. К. Сыркина**. Диссертация к. х. н. по специальности «Физическая химия», «Химия элементно-органических соединений».

Работала в филиале «Всесозного научно-исследовательского химико-фармацевтического института им. С. Орджоникидзе». Диссертация д. х. н. посвящена синтезу новых лекарственных молекул, их физико-химическому изучению, разработке новых технологий получения как оригинальных лекарственных препаратов, так и дженериков.

Почти пятьдесят лет научной деятельности **С. Я. Скачиловой** связаны с АО «Всесоюзным научным центром по безопасности биологически активных веществ» (АО «ВНЦ БАВ»), где она и поныне работает заведующей отделом химии и технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля.

Научная деятельность отражена в более чем 400 научных работах и патентах, монографии «От молекулы до аптеки».

В 1986 году за разработку и создание лекарственных препаратов награждена орденом Почета, в 1995 году за разработку и внедрение новой генерации противоастматических средств награждена премией Правительства РФ, в 2003 году за создание и внедрение в практику нового оригинального антиаритмического препарата «Нибентан» была присуждена Государственная премия Российской Федерации, удостоена звания почетного гражданина города Старая Купавна. Является членом Российского Респираторного Общества и членом Международного Респираторного Общества.

Область научных интересов – медицинская химия и биофармация.

С. Я. Скачилова является постоянным участником и докладчиком Национальных конгрессов «Человек и лекарство», «По болезням органов дыхания», Международного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии».

У **Софии Яковлевны** двое детей, она заботливая бабушка пяти внуков и трех правнуков.

София Яковлевна увлекается классической музыкой, часто бывает в консерватории и в зале П. И. Чайковского, часто посещает выставки и вернисажи в Москве, Санкт-Петербурге, Ногинске и Старой Купавне.

*Редакция журнала поздравляет уважаемую **Софию Яковлевну** с юбилеем! Желаем творческого вдохновения, здоровья и благополучия! Будьте всегда таким светлым, оптимистичным и интересным человеком, высокопрофессиональным специалистом, каким знают Вас ваши родные, коллеги и ученики!*

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 X1, X2 и X3 придумали и разработали эксперимент, авторы X4 и X5 синтезировали образцы и провели их электрохимическое исследование. X3 и X4 провели исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния и ЯМР. Авторы X1 и X6 участвовали в обработке данных. Автор X7 проводил теоретические расчеты. Авторы X1, X2 и X7 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/ЕЕС) и Хельсинкской декларации

В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, номера протокола и даты заседания комитета).

Благодарности

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, должны быть перечислены с их согласия с подзаголовком «Выражение признательности».

ССЫЛКИ В ТЕКСТЕ СТАТЬИ

В журнале применяется **ванкуверский стиль цитирования**: в списке литературы ссылки нумеруются в порядке упоминания в тексте (независимо от языка, на котором дана работа), а не по алфавиту. Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются цифрами в квадратных скобках (ГОСТ Р 7.0.5-2008).

Библиографическая информация должна быть современной, авторитетной и исчерпывающей. Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они были упомянуты. Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Каждый научный факт должен сопровождаться отдельной ссылкой на источник. Если в одном предложении упоминается несколько научных фактов, после каждого из них ставится ссылка (не в конце предложения). При множественных ссылках они даются в порядке хронологии [5–9]. Необходимо убедиться в том, что все ссылки, приведенные в тексте, присутствуют в списке литературы (и наоборот).

Не следует ссылаться: на неопубликованные статьи, на диссертации, а также автореферата 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 р53 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.

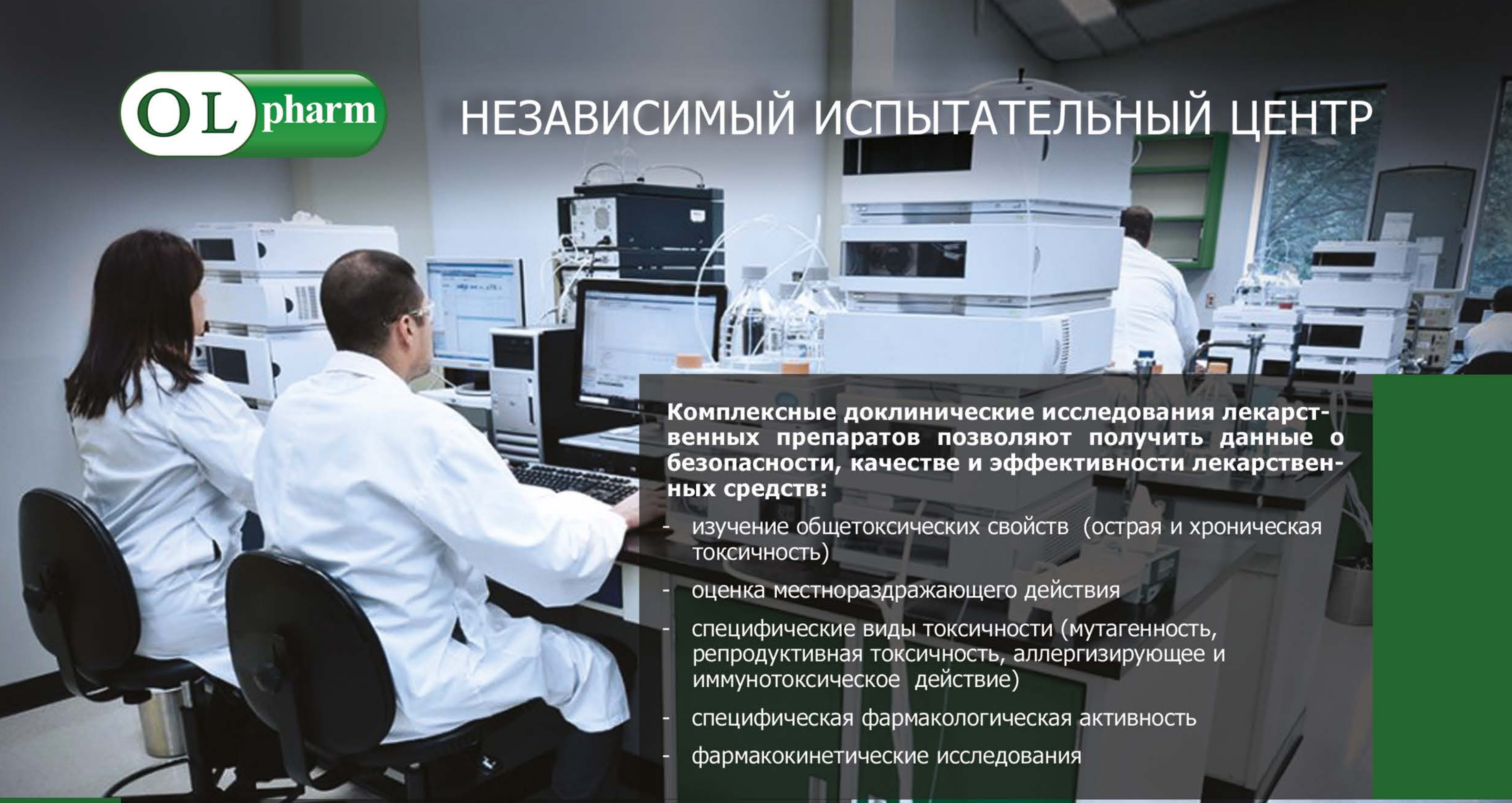
Каждый рисунок должен сопровождаться подрисуночной подписью на русском и английском языках. В подрисуночных подписях не должно быть аббревиатур. Внутририсуночные обозначения подписываются цифрами или латинскими буквами.

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.



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

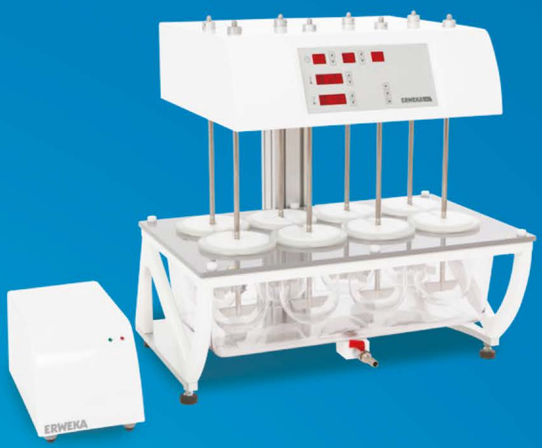
ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

Серия тестеров растворения

ERWEKA DT light

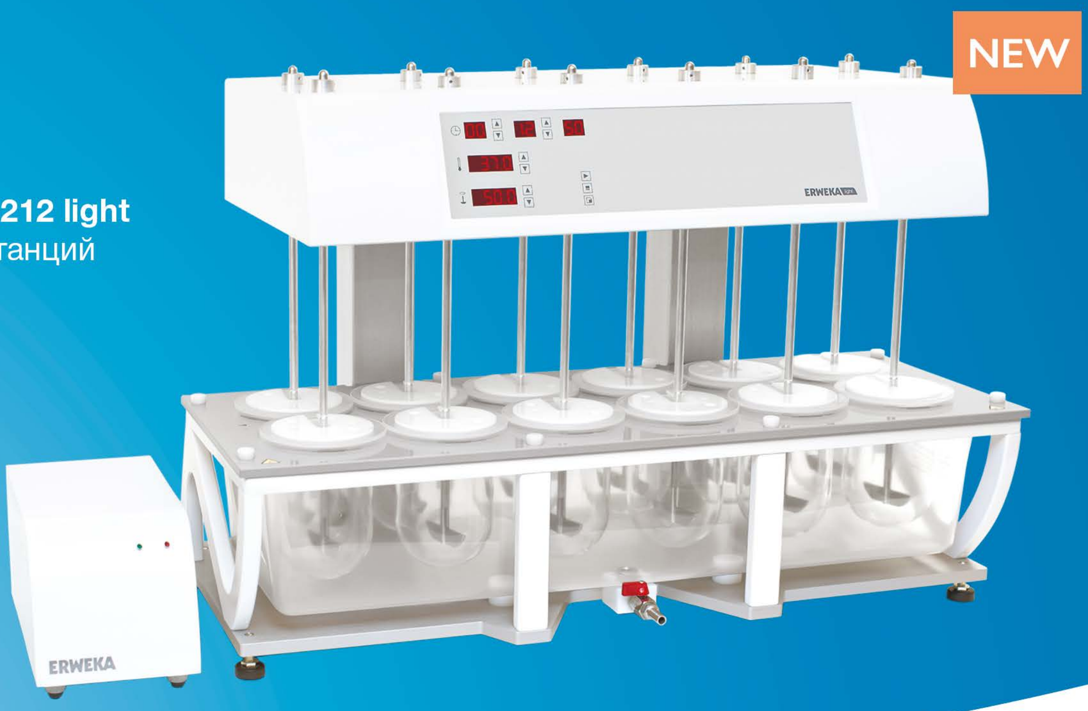
Экономичные тестеры с ручным отбором проб

DT 126 light
6 станций



DT 128 light
8 станций

DT 1212 light
12 станций



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

ERWEKA light